ผลของสารสกัดเหง้าไพลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนทีเอซีวันที่ควบคุมการสร้างซับสแตนพีในเนื้อเยื่อในฟันมนุษย์

INHIBITORY ACTIVITY OF *Zingiber cassumunar* Roxb. RHIZOME EXTRACT ON *TAC-1* SUBSTANCE P GENE IN HUMAN DENTAL PULP CELLS

วิสาขา อุปพงศ์ ลัดดา มีสุข ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา สิทธิชัย ขุนทองแก้ว*

Visakha Aupapnong*, *Ladda Meesuk, Thaweephol Dechatiwongse Na Ayudhya, Sittichai Koontongkaew*

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Faculty of Dentistry, Thammasat University.

****Corresponding author, e-mail:*** *v_aupaphong@hotmail.com*

Received: *March 20, 2018;* ***Revised:*** *October 5, 2018;* ***Accepted:*** *October 9, 2018*

บทคัดย่อ

การอักเสบของเนื้อเยื่อในฟันเป็นสาเหตุหลักของการปวดฟัน การอักเสบของเนื้อเยื่อในฟันนั้นถูกกระตุ้นได้จากหลายสาเหตุ สาเหตุที่พบได้บ่อยมาจากการติดเชื้อจากโรคฟันผุ เมื่อมีการอักเสบเกิดขึ้นในฟันที่มีพื้นที่จำกัดทำให้ความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น ซับสแตนพี (Substance P) ซึ่งถูกควบคุมโดยยีนที่ชื่อว่า ทีเอซีวัน (*TAC-1*) เป็นสารสื่อประสาทที่พบว่ามีมากขึ้นเมื่อเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อในฟัน มีผลทำให้เกิดการปวดและการขยายหลอดเลือดภายในเนื้อเยื่อในฟัน ส่งผลให้การอักเสบยิ่งเลวร้ายต่อเนื้อเยื่อในฟันมากขึ้นจากการเพิ่มแรงดันภายในฟัน จนทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อได้ ไพลเป็นพืชที่มีฤทธิ์สำคัญในการลดการอักเสบ อย่างไรก็ตามผลของไพลต่อซับสแตนพียังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้าไพลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนทีเอซีวันที่ควบคุมการสร้างสารซับสแตนพี โดยนำเซลล์เนื้อเยื่อในฟันมนุษย์ที่ได้รับบริจาคผู้ป่วย 3 คน จำนวน 3 ซี่ มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จากนั้นทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพลต่อเนื้อเยื่อในฟันเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยใช้วิธี MTT นำมาทดสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดไพลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือเด็กซาเมทาโซน (Dexamethasone) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล่าร์ นาน 2 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นนี้ได้ผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ก่อนนำใช้ จากนั้นเติมไลโปโปลีแซคคาไรด์ (Lipopolysccharide) ปรับให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนทีเอซีวัน แล้วเลี้ยงต่อในตู้อบนาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาเซลล์ถูกสกัดเอาอาร์เอ็นเอ (RNA) เพื่อมาวิเคราะห์หาการแสดงออกของยีนทีเอซีวัน ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในสภาพจริง (Realtime-PCR) แล้วนำมาหา

ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ One-Way Anova จากการศึกษาพบว่า สารสกัดไพลในความเข้มข้นที่สูงตั้งแต่ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเด็กซาเมทาโซน 5 ไมโครโมลาร์ มีความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่า IC_{50} 543.40 และ 3.95 ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนทีเอซีวัน พบว่าสารสกัดไพลและเด็กซาเมทาโซน มีการแสดงออกของยีนทีเอซีวันของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันหลังจากถูกกระตุ้นด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์แล้วไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว และพบว่ามีการแสดงออกของยีนทีเอซีวัน น้อยมากกว่า 4 เท่า เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีไลโปโปลีแซคคาไรด์เพียงอย่างเดียว กล่าวโดยสรุปได้ว่าสารสกัดไพลมีแนวโน้มที่สามารถลดการอักเสบของเนื้อเยื่อในฟันได้โดยผ่านยับยั้งการแสดงออกของยีนทีเอซีวัน การศึกษานี้จึงช่วยยืนยันฤทธิ์ในการลดการอักเสบของสารสกัดไพลโดยผ่านการลดการสร้างสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

คำสำคัญ: การลดการอักเสบ ซับสแตนพี ไพล เนื้อเยื่อใน

Abstract

Inflammation of dental pulp tissue is the major cause of tooth pain. Contamination from caries is one of most common cause of pulpal infection and inflammation. When inflammation occurs in restricted area of the tooth, it may cause necrotic pulp tissue. Substance P, be controlled by *TAC-1* gene, is a neurotransmitter which is increasingly in the dental pulp inflammation. It can stimulate neuroreceptor to generate pain and vasodilatation. *Zingiber cassumunar* Roxb. *(Phlai)* is an important medicinal plant to reduce inflammation. However, the effect of Phlai on substance P has not been studied before. Thus, the study attended on the inhibitory effect of Phlai extract on substance P gene expression (*TAC-1*). The dental pulp cells, from 3 donated human teeth, were cultured in the laboratory by explant technique. All substances were investigated the cytotoxicity before used by MTT assay. The experiments started by cell culturing in culture medium supplemented with 100 µg/ml Phlai extract, or 1 µM of dexamethasone for two hours. Lipopolysaccharide (LPS) was added at the concentration 100 µg/ml and further cultured for twenty four hours. The cells were harvested and RNA was the samples to determine the expression of *TAC-1* gene using reatime PCR technique. The results revealed that the concentration of Phlai extract from 250 µg/ml and higher, dexamethasone 5 µM and higher had significant cytotoxicity when were compared with the control group with IC_{50} 543.40 and 3.95, respectively. The Phlai extract and dexamethasone groups similarly expressed of *TAC-1* gene to the control group which were fed with only culture medium. Phlai extract and dexamethasone could inhibit *TAC-1* gene expression in dental pulp cells when they were stimulated by LPS. The *TAC-1* gene expression was lower than 4 times that of the LPS alone. The results suggested that Phlai extract and dexamethasone were likely to reduce neurogenic inflammation by inhibiting *TAC-1* gene expression in LPS-stimulated dental pulp cells.

Keywords: Anti-inflammation, Substance P, *Zingiber cassumunar*, Dental pulp

บทนำ

ความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นในตัวฟันส่วนใหญ่เกิดจากการอักเสบของเนื้อเยื่อในที่อยู่ใจกลางของฟัน ประกอบไปด้วยการทำงานของด้วยเซลล์หลายชนิด หลอดเลือด และเส้นประสาท การอักเสบและความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นนั้นมีความเกี่ยวข้องกับสารสื่อประสาทหลากหลายชนิด เช่น ซับสแตนพี แคลซิโตนินยีนรีเรทเตดเพปไทด์ (Calcitonin gene-related peptide) นิโรไคนินเอ (Neurokinin A) เป็นต้น โดยสารต่าง ๆ เหล่านี้มีผลต่อการไหลเวียนของเลือด และการซึมผ่านของเลือด (Vascular permeability) ส่งผลต่อกระบวนการอักเสบ สารซับสแตนพีจัดอยู่ในกลุ่มแทกกีไคนิน (Tachykinin) ซึ่งเป็นหนึ่งในสารสื่อประสาทที่หลั่งออกมาและเป็นผลให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด พลาสมารั่วออกจากหลอดเลือด เพิ่มการทำงานของมาโครเฟจ (Macrophages) ทำให้เกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ [1] และกระตุ้นเซลล์ประสาทรับความเจ็บปวด โดยมียีนทีเอซีวัน เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างแทกกีไคนินนิวโรเปปไทด์ (Tachykinin neuropeptides) ของมนุษย์ ที่ประกอบไปด้วย ซับสแตนพี นิโรไคนินเอ และนิวโรไคนินบี (Neurokinin B) [2-4] นอกจากซับสแตนพีจะหลั่งออกมาจากปลายของเซลล์ประสาทแล้ว ยังพบว่าเซลล์อื่นสามารถสร้างซับสแตนพีได้เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะจากเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น มาโครเฟจ อีโอสิโนฟิล (Eosinophils) ลิมย์โฟซัยท์ (Lymphocytes) เซลล์เดนไดรท์ (Dendritic cells) และไฟโบรบลาส (Fibroblast) ที่อยู่ในเนื้อเยื่อในฟัน [5] การกระตุ้นการอักเสบเนื้อเยื่อในฟันนั้นมีการตอบสนองทางระบบประสาท โดยผ่านสารสื่อประสาทที่สร้างจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่เป็นอันตรายแล้วทำให้เกิดการทำงานของระบบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Neurogenic inflammation) ได้ด้วยเช่นกัน มีการศึกษาพบการแสดงออกของซับสแตนพีสูงในเนื้อเยื่อในฟันที่มีการอักเสบ [6-7] และเมื่อมีการสร้างซับสแตนพีแล้วตัวซับสแตนพีเองยังสามารถเสริมฤทธิ์การอักเสบของเนื้อเยื่อในฟันมากขึ้นโดยไปกระตุ้นให้เซลล์ในเนื้อเยื่อในฟันสร้างสารน้ำที่ทำให้เกิดการอักเสบ (Proinflammatory cytokine) ได้แก่ เอ็นไซม์ไซโครออกซิจีเนส-2 (Cyclooxygenase-2) อินเตอร์ลิวคิน-8 และอินเตอร์ลิวคิน-10 [8-10] ซึ่งเนื้อเยื่อในฟันอยู่กลางฟันที่มีพื้นที่จำกัดและค่อนข้างแข็ง จัดเป็นพื้นที่ที่มีความยืดหยุ่นน้อย ดังนั้นเมื่อมีการอักเสบมาก ๆ ส่งเสริมให้เกิดแรงดันจนกดหลอดเลือดทำให้เกิดภาวะเนื้อเยื่อตายได้ การอักเสบของเนื้อเยื่อในฟันมีสาเหตุได้หลายอย่าง เช่น อุบัติเหตุ (Trauma) ฟันผุ สารเคมี หรืออุณหภูมิ แต่ทั้งนี้สาเหตุหลักมักเป็นการติดเชื้อที่เป็นผลมาจากโรคฟันผุ ที่มีลักษณะผสมกันหลายชนิด เช่น แบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจน แบคทีเรียที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน โดยเฉพาะกรัมลบและมีบางส่วนเป็นกรัมบวก [11] การเกิดโรคของเนื้อเยื่อในฟันอาจเกิดได้ทั้งจากการลุกล้ำโดยตรงของเชื้อ หรือเกิดจากสารพิษที่เชื้อโรคปล่อยออกมาเมื่อเซลล์แตก ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียกรัมลบ สารพิษที่ปล่อยออกมานี้เป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์แบคทีเรีย เป็นสารประกอบที่เรียกว่า ไลโปโปลีแซคคาไรด์ และสามารถแพร่ผ่านท่อฟันได้ ดังนั้นสารพิษของแบคทีเรียจึงจัดเป็นปัจจัยก่อโรคที่รุนแรง (Virulence factor) อย่างหนึ่งของการเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อในฟัน [12-13]

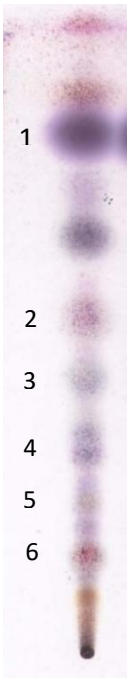
ไพล มีชื่อทางพฤกษาศาสตร์ว่า ซิงจิเบอร์ คาสซูมูนาร์ (*Zingiber cassumunar*) จัดเป็นพืชในวงศ์ซิงจิเบราซิอี (Zingiberaceae) เป็นไม้ล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน ซึ่งเป็นส่วนที่นำมาสกัดไปใช้ในการทดสอบกับเซลล์

เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติด้านการรักษาได้หลากหลาย โดยเฉพาะฤทธิ์ในด้านการลดการอักเสบและลดอาการปวด ไพลมีสารประกอบหลายชนิดที่สามารถลดการอักเสบได้ เช่น มีฤทธิ์ลดการสร้างเอ็นไซม์ไซโครออกซิจีเนส-2 และโพรสตาแกลนดิน อี-2 (Prostaglandin E_2) [14-16] การลดหรือยับยั้งการสร้างซับสแตนพีเป็นกลไกหนึ่งที่จะช่วยลดการอักเสบและการปวดของฟัน ดังที่ทราบกันดีแล้วว่าเมื่อมีการอักเสบขึ้นในเนื้อเยื่อในฟันจะส่งผลให้เกิดการปวดและหากอาการรุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ จะส่งผลให้เกิดอักเสบรุนแรงจนผันกลับไม่ได้หรือเกิดการตายของเนื้อเยื่อในฟัน ดังนั้นไพลซึ่งมีคุณสมบัติในการลดการอักเสบได้ดีนั้น อาจสามารถนำมาพัฒนาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาอาการปวดและการอักเสบของเนื้อเยื่อในฟันเพื่อรักษาความมีชีวิตของเนื้อเยื่อในฟันได้ การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดไพลการยับยั้งการแสดงออกของยีนทีเอซีวัน ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างการสร้างสารสื่อประสาทซับสแตนพี เพื่อยืนยันผลการลดการอักเสบของสารสกัดไพลโดยผ่านทางการยับยั้งการสร้างสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดไพล

สกัดเหง้าไพลแห้งโดยดัดแปลงวิธีของทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา [17-18] นำเหง้าไพลแห้งมาบดให้เป็นผงแล้วนำผงไพลปริมาณ 30 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ความร้อนอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องซอกเลต (Soxhlet extractor) นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ ได้เป็นสารสกัดไพล จากนั้นตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดโดยวิธี โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin-layer chromatography) โดยใช้แผ่นซิลิกาเจล จีเอฟ (Silica gel GF 254) เป็นสารดูดซับ และใช้เฮกเซน: เอทิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 7:3 เป็นน้ำยาแยก (Developing solvent) ระยะทางที่น้ำยาแยกเคลื่อนที่ 15 เซนติเมตร จากนั้นพ่นด้วยอะนิซาลดีไฮด์ ทีเอส (Anisaldehyde TS) อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที และได้โครมาโตแกรมที่มีสารสำคัญเทียบเคียงตามมาตรฐานของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopeia) [19]



ภาพที่ 1 สารสกัดไพล ที่ประกอบด้วยสารสำคัญ ดังนี้ สาร 1 phenylbutanoid, (*E*)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl) but-1,3-diene (hRf 82); สาร 2 phenylbutanoid, (*E*)-4-(3',4'-Dimethoxyphenyl) but-3-en-1-yl acetate (hRf 54); สาร 3 cyclohexene derivative, *cis*-3-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-3''',4'''-dimethoxystyryl]cyclohex-1-ene (hRf 44); สาร 4 cyclohexene derivative, *cis*-3-(3', 4'-Dimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2''',4''', 5'''-trimethoxystyryl]cyclohex-1-ene (hRf 32); สาร 5 cyclohexene derivative, *cis*-3-(2',4', 5'-Trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2''',4''', 5'''-trimethoxystyryl]cyclohex-1-ene; phenylbutanoid (hRf 26), สาร 6 phenylbutanoid, (*E*)-4-(3', 4'-Dimethoxyphenyl) but-3-en-1-ol (hRf 16)

การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในฟันและการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพล

เซลล์เนื้อเยื่อในฟันได้มาจากการบริจาคของผู้ที่มารับการรักษาทางทันตกรรมที่คลินิกทันตกรรมของคณะทันตแพทยศาสตร์ และกลุ่มงานทันตกรรมโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ด้วยการถอนฟันเนื่องจากเหตุผลของการจัดฟันและฟันไม่มีคู่สบเนื่องจากการผ่าฟันคุด จำนวน 3 ซี่ จากผู้มารับบริการ 3 คน เป็นฟันกรามน้อยและฟันกรามซี่ที่สาม ทั้งนี้ก่อนการดำเนินงาน งานวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์เป็นที่เรียบร้อยแล้ว (หนังสือรับรองเลขที่ 048/2556) เซลล์เนื้อเยื่อในฟันถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ที่มียาฆ่าเชื้อเพนนิซิลินเข้มข้น 100 ยูนิต/มิลลิลิตร ยาสเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแอมโฟเทอราซินบี (Amphotericin B) 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด เมื่อเซลล์เจริญได้เพียงพอจึงนำมาเลี้ยงในถาดเลี้ยงชนิด 96 หลุม โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียวและกลุ่มทดลองเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดไพล ใช้ที่ความเข้มข้น

เริ่มต้น 1-1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือเด็กซาเมทาโซน ใช้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1-100 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบการอยู่รอดของเซลล์โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงการผ่านได้สี (MTT assay) วิธีการโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbnance density, OD) ที่ 570 นาโนเมตร ด้วย microplate reader SUNRISE (Tecan, USA) จากนั้นนำมาคำนวนหาอัตราการเจริญของเซลล์ (Percent of growth, PG) ของแต่ละการทดลองดังนี้

อัตราการเจริญของเซลล์ = (ค่าการดูดกลืนแสง$_{กลุ่มทดสอบ}$ /ค่าการดูดกลืนแสง$_{กลุ่มควบคุม}$) x100

นำค่าที่ได้มาหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ถึงร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยใช้สถิติ Non-linear regression ค่าที่ใช้ในการแสดงอยู่ในรูปของอัตราเฉลี่ยการเจริญของเซลล์ และค่าค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ถึงร้อยละ 50 และใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ตามด้วยการเปรียบเทียบพหุคูณ (Dunnett's test) โดยใช้ตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ซี่ โดยแต่ละซี่ได้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การทดสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีนทีเอซีวัน

การเลี้ยงเซลล์เพื่อการทดสอบยีนทีเอซีวัน

เซลล์เนื้อเยื่อในฟัน จำนวน 5×10^5 เซลล์ ถูกเลี้ยงในถาดเลี้ยงชนิด 6 หลุม นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงใหม่ ให้เซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาการเลี้ยงเซลล์อย่างเดียวเป็นกลุ่มควบคุม อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดไพลเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมเด็กซาเมทาโซนเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (Positive control) ทำการเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยการเติมไลโปโปลีแซคคาไรด์ (*Escherichia coli* 0111:B4; Sigma, St Louis, MO) โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยให้เซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมไลโปโปลีแซคคาไรด์เพียงอย่างเดียวเป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) และเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 24 ชั่วโมง

การทดสอบการยับยั้งแสดงออกของยีนทีเอซีวัน โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบสภาพจริง

เมื่อครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมง ทำการสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ไตรซอล (TRizol®) ตามคำแนะนำของบริษัท โดยนำอาร์เอ็นเอ ปริมาณ 300 นาโนกรัม มาเป็นต้นแบบในการเปลี่ยนเป็นสายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่ออาร์เอ็นเอนั้น (cDNA) จากนั้นนำดีเอ็นเอมาเพิ่มจำนวนและตรวจสอบการแสดงออกของยีนทีเอซีวันในเครื่องปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบสภาพจริง ($IQ^{TM}5$ optical system software, Bio-rad) จำนวน 45 รอบ ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นต่าง ๆ ดังนี้ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที เพื่อให้มีการแยกกันของดีเอ็นเอ (Denaturation) และตามด้วย 57 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (Annealing) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่ใช้ในการสร้างปฏิกิริยา (Primer) ดังนี้ ตัวควบคุมภายใน (*GAPDH* (NM_002046)) ความยาว 98 คู่เบส forward 5'- ACAGCCTCAAGATCATCAG-3' และ reverse 5'- GAGTCCTTCCACGATACC-3' ยีนที่ทดสอบ คือ ทีเอซีวัน (NM_013998.2) ความยาว 121 คู่เบส forward 5'- CATGGCCAGATCTCTCAC-3'

และ reverse 5'- GTCATTGCCCATTGACAC-3' นำค่าที่ได้จากค่าเริ่มต้นของจำนวนรอบ (Threshold cycle; C_T) ของแต่ละการทดสอบมาคำนวณหาค่าปริมาณสัมพัทธ์การแสดงออกของยีน (Relative quantification) Livak's method ดังนี้

ขั้นที่ 1

$$\Delta C_{T(test)} = C_{T(target, test)} - C_{T(ref, test)}$$

$$\Delta C_{T(calibrator)} = C_{T(target, calibrator)} - C_{T(ref, calibrator)}$$

ขั้นที่ 2

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(test)} - \Delta C_{T(calibrator)}$$

ขั้นที่ 3

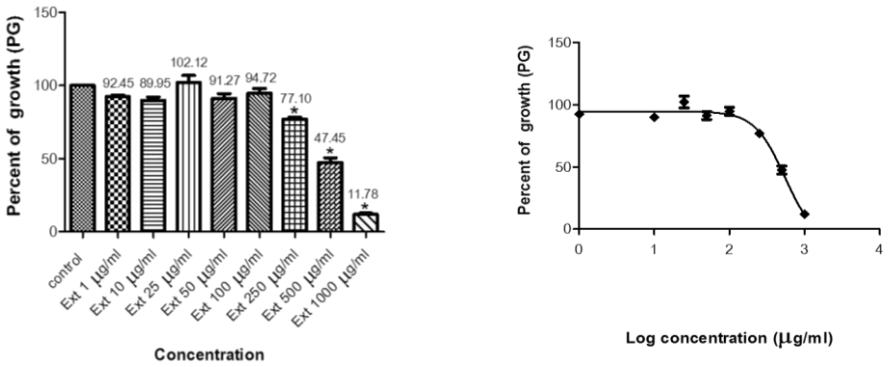
$$2^{-\Delta\Delta CT} = \text{Normalized expression ratio}$$

ค่าที่คำนวณได้แสดงในรูปของสัดส่วนเฉลี่ยของการแสดงออกของยีน (Normalized expression ratio) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด สถิติที่ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มในทุกการทดสอบใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ซี่ โดยแต่ละซี่ได้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

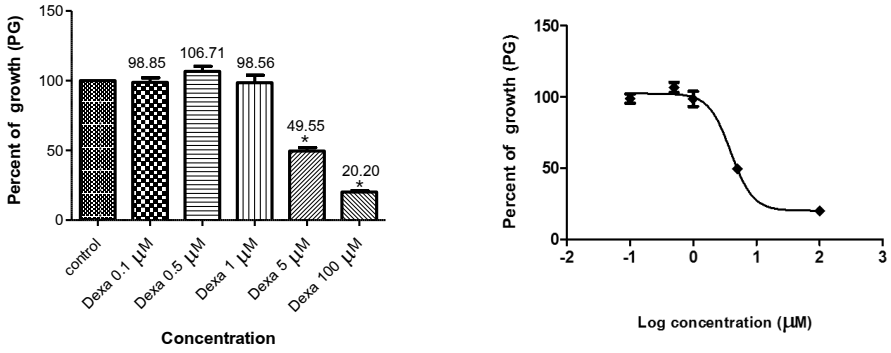
ผลการวิจัย

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดไพลและ เด็กซาเมทาโซน

หลังการเลี้ยงเซลล์ครบ 72 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดไพลที่เริ่มพบว่ามีความแตกต่างในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันจากกลุ่มควบคุมได้อย่างชัดเจน คือ ความเข้มข้นที่ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีเซลล์ที่มีชีวิตรอดเฉลี่ยประมาณร้อยละ 77.10±1.15 และมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 543.40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (95%CI 357.4 - 826.4) ส่วนเด็กซาเมทาโซน พบความแตกต่างในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันจากกลุ่มควบคุมได้อย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นที่ 5 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีเซลล์ที่มีชีวิตรอดเฉลี่ยประมาณร้อยละ 49.55±2.41 และมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 3.95 ไมโครโมลาร์ (95%CI 2.797 - 5.564) ในการศึกษานี้ใช้สารสกัดไพลความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเด็กซาเมทาโซน 1 ไมโครโมลาร์ ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบฤทธิ์ของสารต่อไป



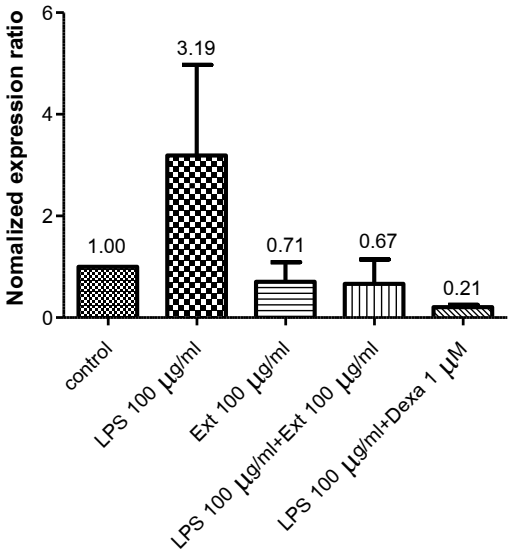
(ก) สารสกัดไพล



(ข) เด็กซาเมทาโซน

ภาพที่ 2 กราฟผลของสารสกัดไพล และเด็กซาเมทาโซนต่อการเจริญของเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน พบว่า (ก) สารสกัดไพล (Ext) สามารถยับยั้งเจริญของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรขึ้นไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control)(*p<.0.05) และมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 543.40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ข) เด็กซาเมทาโซน (Dexa) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control) (*p<.0.05)) และมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 3.95 ไมโครโมลาร์

หลังจากเลี้ยงเซลล์ไว้จนครบ 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบการแสดงออกของยีนทีเอซีวัน พบว่า ไลโปโปลีแซคคาไรด์ สามารถกระตุ้นการแสดงออกยีนทีเอซีวันของเนื้อเยื่อในฟันได้ สารสกัดไพลและเด็กซาเมทาโซนสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนทีเอซีวันได้มากกว่า 4 เท่า แม้ว่าจะถูกกระตุ้นด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์ก็ตาม เมื่อเทียบกับการเลี้ยงด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์เพียงอย่างเดียว ส่วนการแสดงออกของยีนทีเอซีวันของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดไพลหรือเด็กซาเมทาโซน มีการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกับการเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 3 กราฟสัดส่วนเฉลี่ยของการแสดงออกของยีนทีเอซีวันในเซลล์เนื้อเยื่อในฟัน พบว่า หลังการเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมไลโปโปลีแซคคาไรด์ (LPS) เพียงอย่างเดียวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนทีเอซีวันในเซลล์เนื้อเยื่อในฟันได้ ส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมสารสกัดไพล (Ext) เพียงอย่างเดียวไม่พบว่าสารสกัดไพลกระตุ้นการแสดงออกของยีนทีเอซีวัน และเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดไพลหรือเด็กซาเมทาโซน สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนทีเอซีวันของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์ และไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (Control)

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดไพลมีแนวโน้มที่จะสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนทีเอซีวันของเนื้อเยื่อในฟันที่ถูกกระตุ้นด้วยด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์ ยีนทีเอซีวันเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างซับสแตนพี และสารสื่อประสาทหลายชนิด เช่น นิโรไคนิน จากการศึกษาพบว่า ไลโปโปลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นสารพิษที่เชื้อโรคปล่อยสามารถกระตุ้นการสร้างยีนทีเอซีวันได้ คล้ายกับการศึกษาในมาโครเฟจหนูที่พบว่าไลโปโปลีแซคคาไรด์ มีผลในการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างซับซับสแตนพีได้ถึง 6-8 เท่า [20] และพบว่าระดับซับสแตนพีเพิ่มขึ้นถึง 61 เท่า ในหนูที่กระตุ้นให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบด้วยไวรัสและมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพจนเกิดการตายของกล้ามหัวใจได้ [21] มีอีกหลายการศึกษาที่พบว่าเมื่อมีการอักเสบมักพบว่ามีสารซับสแตนพีมากขึ้นในบริเวณที่มีการอักเสบและสารซับสแตนพีเป็นกุญแจสำคัญในการควบคุมการอักเสบ ตัวอย่างเช่น ที่ผิวหนัง ทางเดินอาหารและปอด [22] นอกจากนี้พบว่าซับสแตนพียังส่งเสริมให้เซลล์ไมโครเกลีย (Microglia) ทำหน้าที่คล้ายมาโครเฟจในระบบส่วนกลางของหนูให้ตอบสนองต่อการอักเสบมากขึ้น [23] เนื้อเยื่อในฟันเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันคล้ายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอื่นของร่างกายที่ประกอบไปด้วยหลอดเลือด เซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน ไฟโบรบลาส และเส้นประสาท ดังนั้นเมื่อเกิดการอักเสบขึ้นจึงมีระดับ

ของซับสแตนพีสูงขึ้นด้วยเช่นกันดังเช่นในการศึกษาของ Bowles และคณะที่พบว่าเนื้อเยื่อในฟันอักเสบชนิดผันกลับไม่ได้ (Irreversible pulpitis) มีระดับของซับสแตนพีเพิ่มขึ้นมากกว่า 8 เท่า เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อในฟันที่ได้รับการวินิจฉัยว่าปกติ [6] ดังนั้นผลการลดการอักเสบในเนื้อเยื่อในฟันอาจเกิดขึ้นได้ทั้งการลดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างซับสแตนพีส่งผลต่อการลดระดับของซับสแตนพี และลดการสร้างโพรสตาแกลนดิน อี-2 โดยผ่านการยับยั้งการสร้างเอ็นไซม์ไซโครออกซิจีเนส-2 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าการสารสกัดไพลสามารถลดการอักเสบได้ในสัตว์ทดลอง [24-27] และสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของไพลสามารถลดการสร้างเอ็นไซม์ไซโครออกซิจีเนส-2 ได้ทั้งในระดับยีนและโปรตีน และลดการสร้างโพรสตาแกลนดิน อี-2 ในเนื้อเยื่อในฟันได้อย่างชัดเจน [15] นอกจากนี้สารสกัดจากเหง้าไพลยังสามารถช่วยลดการอักเสบโดยลดการสร้างเอ็นไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส -2 (Matrix metalloproteinases-2) [28] ในเซลล์เหงือกได้ ซึ่งเอ็นไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส -2 เป็นเอ็นไซม์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนในเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ อย่างไรก็ตามสารทุกชนิดหากใช้ในปริมาณหรือระยะเวลาที่ไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดอันตรายได้ และเซลล์แต่ละชนิดมีการตอบสนองต่ออันตรายแตกต่างกัน ในสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดไพลปริมาณสูงสุดที่หนูกินแล้วไม่เกิดพิษคือ 1,125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน [29] ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์ พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดไพลตั้งแต่ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรขึ้นไป จึงจะเห็นได้ชัดเจนว่าเริ่มมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ ซึ่งเมื่อเทียบกับเซลล์เนื้อเยื่อเหงือกพบว่า ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถใช้ในเซลล์เหงือกที่ไม่ควรเกิน 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร [28] ฉะนั้นความเข้มข้นของสารสกัดในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นความเข้มข้นที่น่าจะมีความปลอดภัยและได้ประสิทธิภาพเพียงพอในการยับยั้งยีนทีเอวีวัน จากผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่ก่อให้เกิดการอักเสบหรือส่งเสริมให้เกิดการอักเสบของสารสกัดไพลนั้น น่าจะส่งผลให้สารสกัดไพลเหมาะสมในการที่จะนำไปพัฒนาเพื่อนำมาช่วยในการรักษาการอักเสบในเนื้อเยื่อในฟันและสามารถลดอาการปวดฟันได้ โดยอาจอยู่ผสมอยู่ในสารที่ใช้รักษาเนื้อเยื่อในฟันด้วยวิธีการการปิดทับเนื้อเยื่อในฟัน (Pulp capping) หรือ ผสมกับยาฆ่าเชื้อ (Antibiotic) ที่ใช้ในการรักษาโรคฟันผุ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ศึกษาเพียงในระดับควบคุมการแสดงออกของยีนทีเอซีวัน แต่ยีนทีเอซีวันยังควบคุมการสร้างสารสื่อประสาทได้อีกหลายชนิด ดังนั้นการศึกษาในครั้งต่อไปควรเป็นการศึกษาถึงการยับยั้งการสร้างโปรตีนซับสแตนพีเพิ่มเติมเพื่อยืนยันเส้นทางการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเหง้าไพลได้ชัดเจนมากขึ้น

กิติกรรมประกาศ

ในการนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ผู้ซึ่งให้การสนับสนุนด้านเงินทุนในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

[1] Caviedes-Bucheli J; Munoz HR; Azuero-Holguin MM, & Ulate E. (2008). Neuropeptides in Dental Pulp: The Silent Protagonists. *Journal of Endodontics*. *34*(7), 773-788.

[2] Thomas GJ, & Walsh LJ. (1997). Role Of Substance P in Inflammation in Dental Pulp. *Australian Endodontic Newsletter*. *23*(3), 38-40.

[3] Sacerdote, P, & Levrini L. (2012). Peripheral Mechanisms of Dental Pain: The Role of Substance P. *Mediators of inflammation*. *3*, 951920.

[4] Chiwakata C; Brackmann B; Hunt, N; Davidoff M; Schulze, W, & Ivell, R. (1991). Tachykinin (Substance-P) Gene Expression in Leydig Cells of the Human and Mouse Testis. *Endocrinology*. *128*(5), 2441-2448.

[5] Killough SA; Lundy FT, & Irwin CR. (2009). Substance P Expression by Human Dental Pulp Fibroblasts: A Potential Role in Neurogenic Inflammation. *Journal of Endodontics*. 35(1), 73-77.

[6] Bowles WR; Withrow JC; Lepinski AM, & Hargreaves KM. (2003). Tissue Levels of Immunoreactive Substance P Are Increased in Patients with Irreversible Pulpitis. *Journal of Endodontics*. *29*(4), 265-267.

[7] Caviedes-Bucheli J; Lombana, N; Azuero-Holguin MM, & Munoz HR. (2006). Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, Substance P, Neurokinin A, Neuropeptide Y and Vasoactive Intestinal Polypeptide) Expressed in Healthy and Inflamed Human Dental Pulp. *International Endodontic Journal*. *39*(5), 394-400.

[8] Tokuda M; Miyamoto R; Nagaoka S, & Torii M. (2004). Substance P Enhances Expression of Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Factors in Dental Pulp Cells. *Journal of Endodontics*. *30*(11), 770-773.

[9] Patel T; Park SH; Lin LM; Chiappelli F, & Huang G. (2003). Substance P Induces Interleukin-8 Secretion from Human Dental Pulp Cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. *96*(4), 478-485.

[10] Park SH; Hsiao GY, & Huang, G. (2004). Role of Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide in The Rregulation of Interleukin-8 and Monocyte Chemotactic Protein-1 Expression in Human Dental Pulp. *International Endodontic Journal*. *37*(3), 185-192.

[11] Sundqvist G. (1992) Associations Between Microbial Species in Dental Root Canal Infections. *Oral Microbiology and Immunology*. *7*(5), 257-262.

[12] Botero TM; Mantellini MG; Song W; Hanks CT, & Nor JE. (2003). Effect of Lipopolysaccharides on Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Mouse Pulp Cells and Macrophages. *European Journal of Oral Sciences*. *111*(3), 228-234.

[13] Kawai S; Harada K; Daito K; Arita K, & Ohura K. (2012). TNF-alpha; and LPS Enhance MMP Production in Human Dental Pulp Cells of Deciduous Teeth. *Journal of Hard Tissue Biology*. *21*(2), 151-156.

[14] Anantasan V. (1977). Medical Plants "Plai or Puu Loei" and Researches in Phamacology. *Journal Pharmaceutical Association of Thailand*. *31*, 381-388.

[15] Aupaphong V; Dechatiwonges T, & Koontongkaew S. (2013). Inhibition of Lipopolysaccharide-induced Expression of Cyclooxygenase-2 by *Zingiber cassumunar* Roxb. Constituents in Human Dental Pulp Cells. *Journal of Medicinal Plants Research*. *7*(33), 2451-2458.

[16] Wanauppathamkul S. (2003). *Plaitanoids.* Pathumthani: The Innovation Development Fund & International Laboratories Corp., Ltd.

[17] Dechatiwongse T. (1976). Isolation of Constituents from the Rhizome of Plai (*Zingiber Cassumunar* Roxb.). *The Bulletin of the Department of Medical Sciences*. *3*, 75-79.

[18] Dechatiwongse T, & Yoshihira K. (1973). Chemical Studies on the Rhizomes of Plai (*Zingiber cassumunar* Roxb.). *The Bulletin of the Department of Medical Sciences*. *15*(4), 1-15.

[19] Thai Herbal Pharmacopoeia Committee. (2009). *Thai Herbal Pharmacopoeia* volumn I. 3rd ed. Nonthaburi, Thailand: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. pp. 51-56, 113.

[20] Bost KL; Breeding SA, & Pascual DW. (1992). Modulation of the mRNAs Encoding Substance P and Its Receptor in Rat Macrophages by LPS. *Regional immunology*. *4*(2), 105-112.

[21] Robinson P; Garza A; Moore J; Eckols TK; Parti S, & Balaji V, et al. (2009). Substance P is Required for The Pathogenesis of EMCV Infection in Mice. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. *2*(1), 76-86

[22] Johnson MB; Young AD, & Marriott I. (2016).The Therapeutic Potential of Targeting Substance P/NK-1R Interactions in Inflammatory CNS Disorders. *Front Cell Neurosci*. *10*, 296.

[23] Rasley A; Marriott I; Halberstadt CR; Bost KL, & Anguita J. (2004). Substance P Augments Borrelia Burgdorferi-induced Prostaglandin E2 Production by Murine Microglia. *Journal of immunology*. *172*(9), 5707-5713.

[24] Ozaki Y; Kawahara N, & Harada M. (1991). Anti-inflammatory Effect of *Zingiber cassumunar* Roxb. and Its Active Principles. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. *39*, 2353-2356.

[25] Panthong, A; Kanjanapothi, D; Niwatananun V, Tuntiwachwutikul P, & Reutrakul, V. (1990). Anti-inflammatory Activity of Compounds Isolated from *Zingiber cassumunar. Planta Med*. *56*, 655.

[26] Pongprayoon U; Soonthornsaratune P; Jarikasem S; Sematong T; Wasuwat S, & Claeson, P. (1997). Topical Antiinflammatory Activity of The Major Lipophilic Constituents of the Rhizome of *Zingiber cassumunar*. Part I: The Essential Oil. *Phytomedicine*. *3*(4), 319-22.

[27] Pongprayoon U; Tuchinda P; Claeson P; Sematong T; Reutrakul, V, & Soonthornsaratune, P. (1997). Topical Antiinflammatory Activity of The Major Lipophilic Constituents of The Rhizome of *Zingiber cassumunar*. Part II: Haxane Extractives. *Phytomedicine*. *3*(4), 323-6.

[28] Koontongkaew, S; Meesuk, L; Aupaphong, V; Dechatiwongse, T, & Poachanukoon O. (2013). Inhibitory Effect of *Zingiber cassumunar* Extracts on Lipopolysaccharide-induced Cyclooxygenase-2 and Matrix Metalloproteinase Expression in Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*. *48*(4), 507-516.

[29] Koontongkaew S; Poachanukoon O; Sireeratawong S; Dechatiwongse T; Khonsung P, & Jaijoy K; et al. (2014). Safety Evaluation of *Zingiber cassumunar* Roxb. Rhizome Extract: Acute and Chronic Toxicity Studies in Rats. *International Scholarly Research Notices*. p. 14.