การแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

จรัสลักษณ์ สุขอวยชัย* อินทรา วงศ์เยาว์ฟ้า นิรดา ธเนศวร*****

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์ปฐมภูมิกระดูกเบ้าฟันมนุษย์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 ไลน์ ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีและไม่มีไลโปโพลีแซคคาไรด์ปริมาณ 0.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอีกการทดลองหนึ่ง เลี้ยงเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นเวลา 7 วัน แล้วกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่ออีก 7 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนด ตรวจสอบการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ และวิธีอิไลซา

ผลการศึกษา: จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 ไลน์มีการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 และมีการเพิ่มระดับขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ สอดคล้องกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ผลของอิไลซายืนยันการพบอินเตอร์ลิวคิน-8 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเพิ่มระดับขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

สรุป: เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์เป็นแหล่งในการผลิตอินเตอร์ลิวคิน-8 ความเข้าใจในกลไกของกระบวนการดังกล่าวมีความสำคัญ อาจนำไปสู่การพัฒนาการรักษารอยโรครอบปลายรากฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: อินเตอร์ลิวคิน-8 ไลโปโพลีแซคคาไรด์ เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ รอยโรครอบปลายรากฟัน

**ทันตแพทย์ชำนาญการ กลุ่มงานบริการทันตสาธารณสุข 3 กองทันตสาธารณสุข สำนักอนามัย ศูนย์บริการสาธารณสุข 10 ถนนสุขุมวิท แขวงคลองตัน เขตคลองเตย กรุงเทพมหานคร 10110*

***อาจารย์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110*

****รองศาสตราจารย์ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110*

Expression of Interleukin-8 in Human Alveolar Bone Cells Stimulated by Lipopolysaccharide

Jarasluck Suk-auychai* Indra Wongyaofa Nirada Dhanesuan*****

Abstract

Objective: This study aimed to investigate interleukin-8 (IL-8) expression in primary human alveolar bone cells (ALV) in culture media as well as stimulated by lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli (E. Coli).*

Material and Methods: Three lines of ALV were cultured in the presence or absence of 0.5 and 5 µg/ml of LPS for 24 hours. In another experiment, ALV were cultured in osteogenic media to induce *in vitro* osteogenic differentiation for 1 week. LPS at 0.5 or 5 µg/ml were then added to the cells and cultured for another week. At the end point, mRNA was extracted and real-time PCR was performed to assess IL-8 expression. Cultured media was also collected and ELISA was performed to assess secreted IL-8 protein.

Results: At 24-hour culture, all three ALV lines expressed IL-8 mRNA (adjusted to 1 relative to GAPDH) and the level of the up-regulations were increased by the stimulation of 0.5 and 5 µg/ml of LPS (ALV1: 1/ 1809/ 2034, ALV2: 1/ 485.64/ 752.56, ALV3: 1/ 1036.19/ 2410.71). In the osteogenic media, similar result was observed (ALV1: 1/ 429.87/ 2073.65, ALV2: 1/ 93.49/ 322.45, ALV3: 1/ 311.6/ 158.57). ELISA confirmed the secretion of IL-8 (6.83 ± 0.44 ng/ml) by ALV in the media and the up-regulations by 0.5 and 5 µg/ml of LPS stimulation were 108.28 ± 6.18 and 108.42 ± 8.42 ng/ml, respectively.

Conclusion: This study revealed ALV as a source of IL-8 when challenged by bacterial LPS. Understanding of its mechanism and pathway is crucial for development of a better treatment for periapical lesion in the future.

Key words: Interleukin-8, Lipopolysaccharide, Human alveolar bone cells, Periapical lesion

**Dentist, Department of Dental Health Services 3, Dental Health Division, Bureau of Health, Bangkok. Health Center 10, Sukhumvit Road, Klongton, Klongtoey, Bankok 10110*

***Lecturer, Department of Conservative Dentistry and Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok 10110*

****Associate Professor, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok 10110*

บทนำ

ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide: LPS) เป็นส่วนประกอบบนผนังเซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ จัดเป็นปัจจัยที่มีความรุนแรง (virulence factors) ที่สำคัญและก่อให้เกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในและเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน เริ่มต้นจากการติดเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่คลองรากฟัน มีการลุกลามสู่เนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน ซึ่งร่างกายจะตอบสนองด้วยการเกิดกระบวนการอักเสบ มีการสร้างและหลั่งไซโทไคน์อักเสบต่างๆ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์แอลฟา พรอสตาแกรนดินอีทู และไนตริกออกไซด์ เป็นต้น ทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ และเกิดเป็นรอยโรครอบรากฟัน [1-3]

อินเตอร์ลิวคิน-8 เป็นไซโทไคน์อักเสบชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างในระยะแรกของการอักเสบ มีหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวกัน (chemotaxis) และกระตุ้นการทำงานของเซลล์อักเสบนิวโทรฟิล (neutrophils) ให้มีการสร้างและปลดปล่อยเอนไซน์ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide) ออกสู่ภายนอกเซลล์ อินเตอร์ลิวคิน-8 ถูกสร้างได้จากเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์ฟาโกไซต์ (phagocytes) เซลล์โมโนไซต์ (monocytes) เซลล์บุผิว (epithelium cells) เซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells) เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) และเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblasts) [4-6] สามารถตรวจพบอินเตอร์ลิวคิน-8 ได้ในเนื้อเยื่อในฟันและเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันที่มีการอักเสบ [7-9] นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในน้ำเหลืองเหงือก (gingival crevicular fluid) ของฟันที่มีการอักเสบเฉียบพลันของเนื้อเยื่อในฟันและฟันที่มีโรคปริทันต์อักเสบ [10-12]

เซลล์กระดูกนอกจากทำหน้าที่รักษาโครงสร้างของกระดูกในสภาวะปกติแล้ว ยังสามารถสร้างไซโทไคน์อักเสบต่างๆ เพื่อตอบสนองต่อการรุกรานของแบคทีเรียได้ เช่น เมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูกด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์พบมีการหลั่งเอนไซม์สลายคอลลาเจน [13] อินเตอร์ลิวคิน-6 [14-16] และไนตริกออกไซด์ [17] ซึ่งมีผลให้เกิดการสูญสลายกระดูกในอวัยวะปริทันต์รอบรากฟันได้ [18]

การศึกษาในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ยังมีไม่มากนัก มีเพียงการศึกษาถึงผลของแรงกดต่อการแสดงออกของไซโทไคน์อักเสบต่างๆ [19] และการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้ (อินทรา และคณะ) [20] ซึ่งพบมีการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน-6 เพิ่มมากขึ้นเมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอร์ริเชีย โคไล *(Escherichia coli: E.coli)* เท่านั้น

จากเหตุผลดังกล่าวทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะทำการศึกษาถึงผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเข้าใจกลไกการเกิดพยาธิสภาพ การดำเนินของรอยโรครอบปลายรากฟันได้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากขึ้น

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จากชิ้นกระดูกเบ้าฟันที่ไม่มีรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์จากผู้ป่วยที่มารับการผ่าฟันคุดที่ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในงานวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ 12 /2555 และได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย

นำชิ้นกระดูกเบ้าฟันมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ปราศจากเชื้อ (Sterile Phosphate Buffer Saline: PBS) ให้สะอาด ตัดชิ้นกระดูกให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยมีดผ่าตัด นำชิ้นกระดูกมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มเอฟ 12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium F12: DMEM F12, Gibco®, Carlsbad, CA, USA) ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 (10% Fetal calf serum: FCS, Gibco®) กลูตามีน (glutamine, Invitrogen, Grand Island, NY)

ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา (antibiotics and anti-mycotics, Invitrogen, Grand Island, NY) ทำการเลี้ยงเซลล์ในตู้อบที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รอจนเซลล์จากชิ้นกระดูกเจริญออกมาอยู่บนจานเลี้ยงเซลล์ และเจริญเต็มพื้นที่ของจานเลี้ยงเซลล์จึงทำการถ่ายเซลล์ลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ (subculture) ในอัตราส่วน 1:2 โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA, Gibco®) เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM, Gibco®)ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 (10% FCS-DMEM)

การทดสอบความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยง (in vitro mineralization)

ทำการถ่ายเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6 well plate) ให้มีความหนาแน่น 150,000 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FCS-DMEM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจะแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่เลี้ยงในอาหารชนิดเดิม (10% FCS-DMEM) และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (osteogenic media) ซึ่งมีส่วนผสมของกรดแอสคอบิค (ascorbic acid, Gibco®) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เบต้ากลีเซอโรฟอตเฟส (β-glycerophosphate, Gibco®) 1.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเดกซาเมธาโซน (dexamethasone, Gibco®) 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน ทำการย้อมสีอะลิซารินเรดเอส (Alizarin Red S, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) โดยทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ปราศจากเชื้อ เติมเมทานอลทิ้งไว้ 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น เติมสีอะลิซารินเรดเอสทิ้งไว้ 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง แล้วตากแห้งในที่มืด

ตัวอย่างเซลล์ที่จะนำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้จะเป็นเซลล์จากผู้ป่วยจำนวน 3 ไลน์ (ALV1, ALV2 และ ALV3) ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมสีอะลิซารินเรดเอส และเป็นเซลล์ในรุ่นที่ 3 ถึง 8 เท่านั้น โดยแต่ละเซลล์ตัวอย่างจะถูกนำมาทดลองแบบเดียวกันซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate) ในทุกขั้นตอนของวิธีการวิจัย

การเตรียมไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอร์ริเชียโคไล

สารบริสุทธิ์ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเอสเชอร์ริเชียโคไล L2630 (0111:B4, Sigma) ถูกเตรียมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

การกระตุ้นเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

ทำการถ่ายเซลล์ที่เลี้ยงไว้ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ให้มีความหนาแน่น 150,000 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FCS-DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 2.5 (2.5% FCS-DMEM)เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วยกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นใดๆ กลุ่มที่กระตุ้นเซลล์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การกระตุ้นเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

ทำการถ่ายเซลล์ที่เลี้ยงไว้ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม ให้มีความหนาแน่น 150,000 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง และมีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 2.5 (2.5% FCS) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วยกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นใดๆ กลุ่มที่กระตุ้น

เซลล์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อไปอีกเป็นเวลา 7 วัน โดยยังคงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งตลอดการทดลอง

การวิเคราะห์การแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในระดับอาร์เอ็นเอ

หลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ทำการสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction) โดยใช้ไตรซอล (Trizol® Reagent, Gibco®) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทำการสังเคราะห์คอมพลีเมนต์ทารี่ดีเอ็นเอสแตรนด์ด้วยชุดสังเคราะห์สำเร็จรูป อิมพรอม-ทู ทีเอ็ม รีเวิร์สทรานสคริปชั่น (ImProm-II TM Reverse Transcription System) (Promega, Madison, WI, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต แล้วเก็บซีดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีเรียล-ไทม์ โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (real-time polymerase chain reaction: RT-PCR) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche Diagnostics Corporation, IN, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-8 และจีเอพีดีเอช (Glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) สังเคราะห์โดยบริษัทไบโอจีโนเมด (Biogenomed Co LTD., BKK, Thailand) มีความยาวระหว่าง 18 ถึง 25 เบส ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ของ อินเตอร์ลิวคิน-8 และจีเอพีดีเอช

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	แหล่งที่มา
GAPDH	forward; 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT -3' reverse; 5'-TCACACCCATGACGAACATGG -3'	[32]
IL-8	forward; 5'-AGCTGGCCGTGGCTCTCT-3' reverse; 5'-CCTTGGCAAAACTGCACCTT-3'	[33]

การศึกษาการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในระดับโปรตีนด้วยวิธีอิไลซา (enzyme-linked immunoadsorbent assay: ELISA)

หลังจากเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง และมีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 2.5 เป็นเวลา 7 วัน แล้วกระตุ้นเซลล์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อเป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ระดับโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยชุดทดสอบอีไลซาสำเร็จรูป (Quantikine® ELISA, R&D Systems Inc, MN, USA) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของอินเตอร์ลิวคิน-8 โดยคำนวณจากสมการที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะถูกนำมาทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในระดับอาร์เอ็นเอด้วยสถิติเชิงพรรณนา วิเคราะห์ความแตกต่างในการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในระดับโปรตีนระหว่างกลุ่มต่างๆ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปเอสพีเอสเอส 14 (SPSS 14.0)

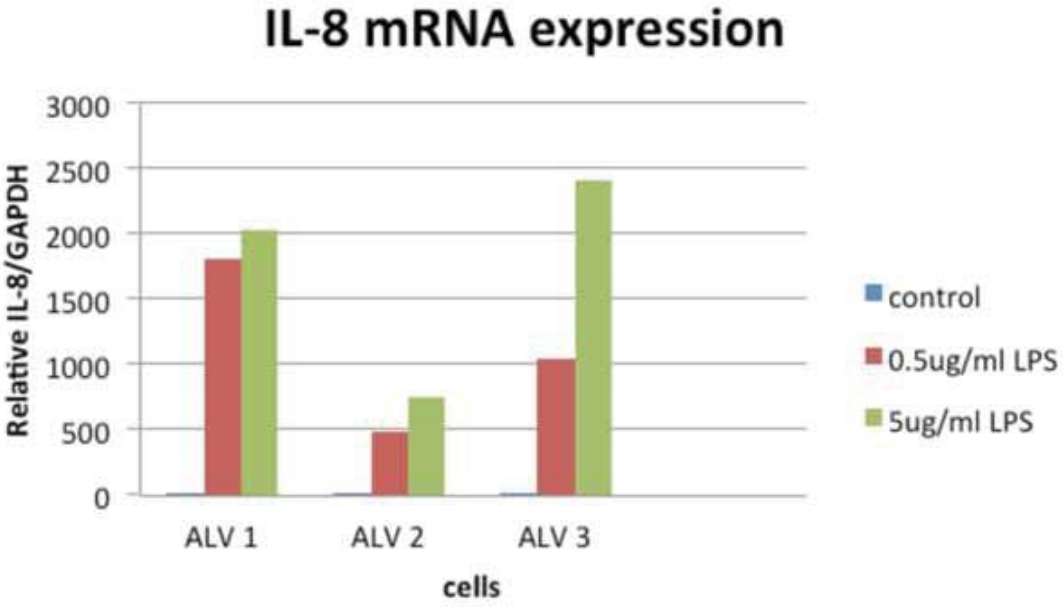
ผลการทดลอง

ในเบื้องต้นได้นำเซลล์กระดูกเบ้าฟันจากผู้ป่วยทั้ง 3 ไลน์ มาทดสอบความสามารถในการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยง พบว่าที่ระยะเวลา 14 วัน เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งมีการตกตะกอนแคลเซียมโดยย้อมติดสีแดงของอะลิซารินเรดเอส ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของซีรัมจากลูกอ่อนวัวร้อยละ 10 ไม่พบมีการตกตะกอนแคลเซียม และไม่มีการติดสีแดง ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 ไลน์ พบว่า ALV3 มีการติดสีแดงเข้ม ชัดเจนที่สุด ในขณะที่ ALV1 และ ALV2 มีการติดสีที่ใกล้เคียงกัน และอ่อนกว่า ALV3 เล็กน้อย

รูปที่ 1 ผลการย้อมสีอะลิซารินเรดเอสเพื่อทดสอบการตกตะกอนแคลเซียมในจานเลี้ยงโดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ตามปกติ (a) และเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (b)

ผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 ไลน์ มีการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับยีนควบคุมจีเอพีดีเอชด้วยวิธีเรียล-ไทม์พีซีอาร์ ณ เวลา 24 ชั่วโมงพบว่าทั้ง 3 ไลน์มีการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 โดยมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออก เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณ 0.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 ไลน์มีการเพิ่มขึ้นของอินเตอร์ลิวคิน-8 ที่ ตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ปริมาณ 0.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้ เซลล์ ALV1 มีการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 1,809.00 และ 2,034.00 เท่า เซลล์ ALV2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 485.64 และ 752.56 เท่า และเซลล์ ALV3 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 1,036.19 และ 2,410.71 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 2

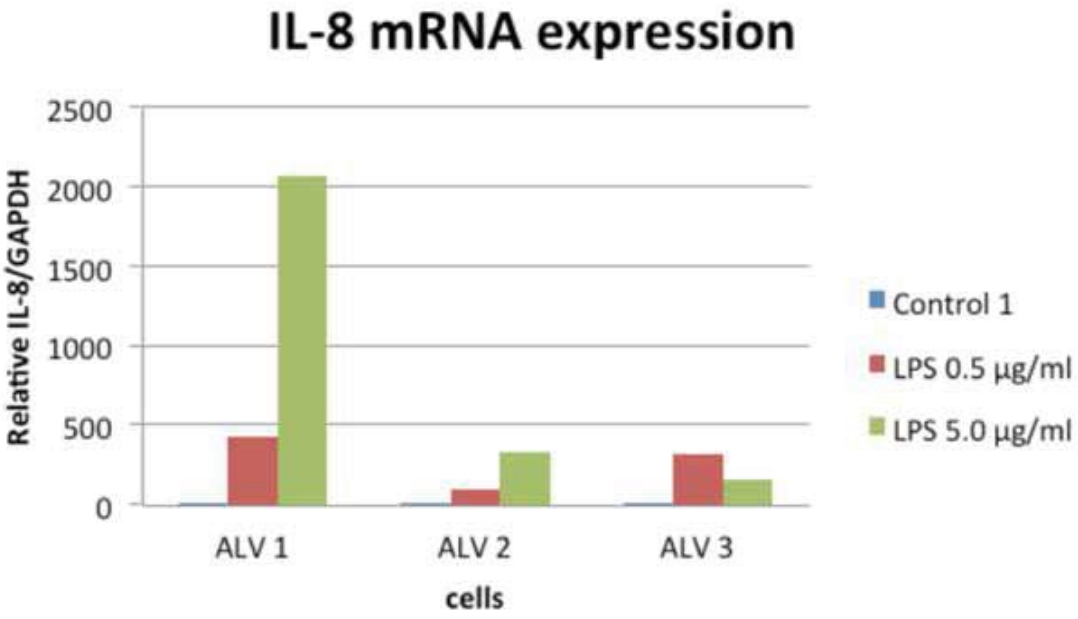


รูปที่ 2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (2.5%FCS-DMEM) กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในระดับอาร์เอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ภายหลังการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ปริมาณ 0.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับยีนจีเอพีดีเอชและปรับให้กลุ่มควบของเซลล์ในทุกไลน์มีค่าเท่ากับ 1

ผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

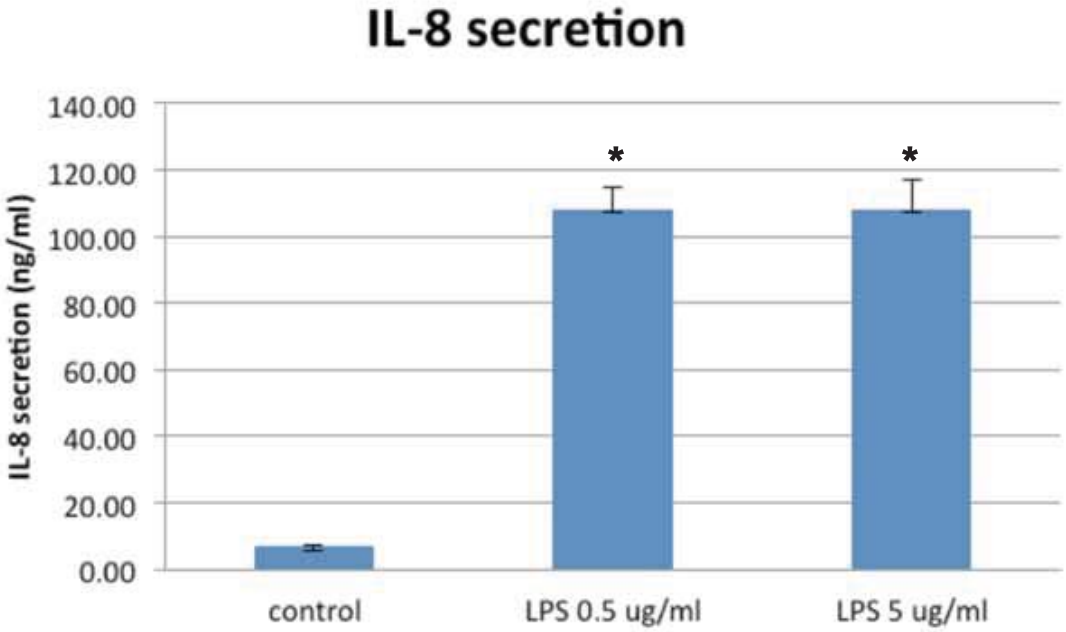
เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเป็นเวลา 7 วัน และกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียต่ออีก 7 วัน พบว่าเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์เพิ่มการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในระดับอาร์เอ็นเอมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น โดยทั้ง 3 ไลน์มีระดับการตอบสนองที่แตกต่างกันดังนี้ เซลล์ ALV1 มีการเพิ่มการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 เป็น 429.87 และ 2,073.65 เท่า เซลล์ ALV2 เพิ่มแสดงออกเป็น 93.49 และ 322.45 เท่า ส่วนเซลล์ ALV3 เพิ่มการแสดงออกเป็น 311.60 และ 158.57 เท่า เมื่อกระตุ้นเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ปริมาณ 0.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ภายใต้สภาวะที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง กราฟแท่งแสดงสัดส่วนการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในระดับอาร์เอ็นเอที่เพิ่มขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ปริมาณ 0.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับยีนจีเอพีดีเอช และปรับให้กลุ่มควบคุมของเซลล์ในทุกไลน์มีค่าเท่ากับ 1

ผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการหลั่งโปรตีนอินเตอร์ลิวคิน-8 ของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์มีการหลั่งโปรตีนอินเตอร์ลิวคิน-8 จากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นใดๆ ในปริมาณ 6.83 ± 0.44 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการเพิ่มปริมาณเป็น 108.28 ± 6.18 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 108.42 ± 8.42 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ขนาด 0.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กล่าวคือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างไลโปโพลีแซคคาไรด์ทั้ง 2 ขนาด ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ภายใต้สภาวะที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง กราฟแท่งแสดงปริมาณการหลั่งโปรตีนอินเตอร์ลิวคิน-8 จากเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ภายหลังการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ปริมาณ 0, 0.5 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (* แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

บทวิจารณ์

อินเตอร์ลิวคิน-8 เป็นไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์คีโมแทคติคที่รุนแรง (potent chemotactic) มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ โดยกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวกันและกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิล ส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ อินเตอร์ลิวคิน-8 ถูกสร้างและหลั่งออกมาโดยเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์ฟาโกไซต์ เซลล์โมโนไซต์ เซลล์เยื่อบุผิว เซลล์บุหลอดเลือด เซลล์สร้างเส้นใย รวมถึงเซลล์กระดูก [21-23] การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเนื้อเยื่อในฟันที่มีการอักเสบ และรอยโรครอบปลายรากฟันจะมีปริมาณไซโทไคน์อักเสบชนิดต่างๆ ทั้งอินเตอร์ลิวคิน-1 อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 และเซลล์นิวโทรฟิล สูงขึ้นกว่าปกติ [24-26]

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นเซลล์ปฐมภูมิที่เพาะเลี้ยงจากกระดูกเบ้าฟันของผู้ป่วย 3 ราย จึงมีความแตกต่างพื้นฐานบางประการ ทั้งระดับการสะสมแคลเซียมในจานเลี้ยงเมื่อกระตุ้นให้มีการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง รวมถึงความแตกต่างในระดับการเพิ่มขึ้นของอินเตอร์ลิวคิน-8 ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากธรรมชาติของการเป็นเซลล์ปฐมภูมิ หรือจากวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิคเรียล-ไทม์ พีซีอาร์ ซึ่งมีความอ่อนไหวเป็นอย่างมาก (high sensitivity) อีกด้วย การเลือกใช้เซลล์ไลน์ที่เป็นเซลล์กระดูกอาจช่วยให้ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันมากขึ้น แต่การตอบสนองของเซลล์ไลน์อาจแตกต่างจากเซลล์ปฐมภูมิ

หรือเนื้อเยื่อกระดูกของมนุษย์ ในการทดลองเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง มีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดการตอบสนองที่ใกล้เคียงกับเซลล์กระดูกมากที่สุด [27] ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 สภาวะ ดังกล่าวมีความสอดคล้องกัน กล่าวคือ เซลล์ปฐมภูมิทั้ง 3 ไลน์มีการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 และเมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ส่งผลให้มีการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 เพิ่มมากขึ้นทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีน ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Yang และคณะในปี 2003 [22] ที่พบการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์ไลน์ออสติโอซาร์โคมา (U2-OS) เพิ่มสูงขึ้นภายหลังการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส *(Porphyromonas gingivalis: P.gingivalis)* พอร์ไฟโรโมแนส เอนโดดอนทาลิส (Porphyromonas endodontalis: P. endodontalis) และพรีโวเทลลา อินเทอร์มีเดีย *(Prevotella intermedia: P. intermedia)* แต่เมื่อเปรียบเทียบผลจากการเลี้ยงเซลล์ใน 2 สภาวะ สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของผลการทดลองได้เช่นกันแม้จะเป็นเซลล์จากผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยอาจมีสาเหตุจากการที่เซลล์อยู่ในระยะแปรสภาพ (differentiation stage) ที่ต่างกัน [27] และระยะเวลาที่กระตุ้นเซลล์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์แตกต่างกัน

ผลจากการศึกษานี้ยังสนับสนุนผลการวิจัยต่างๆ ที่ศึกษาในเซลล์ชนิดอื่นๆ ของร่างกายมนุษย์ เช่น การศึกษาของ Yamaji และคณะในปี 1995 [28] ซึ่งพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มีการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-8 เพิ่มมากขึ้น ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีน โดยเพิ่มขึ้นตามปริมาณการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียเอสเชอร์ริเชีย โคไล และสอดคล้องกันกับการศึกษาของ Herath และคณะในปี 2011 [29] ที่พบปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8 เพิ่มขึ้น เมื่อกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียเอสเชอร์ริเชีย โคไล และแปรผันตามปริมาณไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้ในการกระตุ้น แต่การศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของปริมาณการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8 หลังกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ทั้ง 2 ปริมาณ ซึ่งอาจเป็นผลจากความแตกต่างระหว่างเซลล์แต่ละชนิด ในขณะที่สังเกตพบว่าการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณของไลโปโพลีแซคคาไรด์ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป โดยเพิ่มจำนวนในการทดลองให้เพียงพอที่จะทดสอบหาความสัมพันธ์ทางสถิติ

ผลการศึกษานี้ยืนยันว่า เซลล์กระดูกของมนุษย์มีการตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ด้วยการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-8 จึงน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพหรือการลุกลามของรอยโรคในกระดูกขากรรไกร [30] โดยอินเตอร์ลิวคิน-8 ที่พบในรอยโรครอบปลายรากฟันกระตุ้นให้เซลล์อักเสบ เช่น นิวโทรฟิล และทีเซลล์ (T cells) รวมตัวกัน มีการปล่อยเอนไซม์ต่างๆออกมา เหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญของเซลล์สลายกระดูก ซึ่งก่อให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน [31] นอกจากนี้ยังพบว่าในรอยโรครอบปลายรากฟันของผู้ป่วยที่มีอาการอักเสบจะมีปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-8 และเซลล์อักเสบนิวโทรฟิลในระดับที่สูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีอาการ

การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการยับยั้งการหลั่งและการทำงานของอินเตอร์ลิวคิน-8 น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาไปสู่แนวทางในการรักษารอยโรคในช่องปากต่อไป

บทสรุป

ภายใต้สภาวะของการวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่าเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์มีการเพิ่มการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีน ของอินเตอร์ลิวคิน-8 มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยประจำปีการศึกษา 2555

เอกสารอ้างอิง

1. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Minireview: Bacterially induced bone destruction: Mechanisms and misconceptions. Infect Immun 1996; 64(7): 2371-2380.

2. Fouad AF, Acosta AW. Periapical lesion progression and cytokine expression in an LPS hyporesponsive model. Int Endod J 2001; 34(7): 506-513.

3. Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. J Oral Pathol Med 2009.; 38(2): 605-11.

4. Jiang Y, Russell R, Schilder H, Graves DT. Endodontic pathogens stimulate Monocyte Chemoattractant Protein-1 and interleukin-8 in Mononuclear Cells J Endod 1998; 24(2): 86-90.

5. Dommisch H, Steglich M, Eberhard J, Winter J, Jepsen S. Phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor LY 294002 blocks Streptococcus mutans-induced interleukin (IL)-6 and IL-8 gene expression in odontoblast-like cells. Int Endod J 2008; 41(9): 763-771.

6. Chaudhary LR, Avioli LV. Dexamethasone regualtes IL-1β and TNF-αInduced Interleukin-8 production in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. Calcif Tissue Int 1994; 55(1): 16-20.

7. de Sa AR, Pimenta FJGS, Dutra WO, Gomez RS. Immunolocalization of interleukin4, interleukin6, and lymphotoxinα in dental granuloma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003; 96(5): 356-60.

8. Marton IJ, Rot A, Schwarzinger E, Szakall S, Radics T, Valyi-Nagy I, et al. Differential.in situ distrubution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human chronic periapical granuloma. Oral Microbiol Immunol 2000; 15(3): 139-150.

9. McLachlan JL, Sloan AJ, Smith AJ, Landini G, Cooper PR. S100 and cytokine expression in cariess. Infect Immun 2004; 72(7): 4102-4108.

10. Karapanou V, Kempuraj D, Theoharides TC. Interleukin-8 is increased in gingival crevicular fluid from patients with acute pulpitis. J Endod 2008; 34(2): 148-151.

11. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Level of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. J Periodontol 2000; 71(10): 1535-1545.

12. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Level of interleukin-1 beta and Interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. J Periodontol 1995; 66(10): 852-859.

13. Sismey-Durrant HJ, Atkinson SJ, Hopps RM, Heath JK. The effect of lipopolysaccharide from Bacteroids Gingivalis and Muramyl dipeptide on osteoblast collagenase release. Calcif Tissue Int 1989; 44(5): 361-363.

14. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. JImmunol 1990; 145(10): 3297-3303.

15. Maruyama K, Sano G, Matsuo K. Murine osteoblasts respond to LPS and IFN-γ similary to macrophages. J Bone Miner Metab 2006; 24(6): 454-460.

16. Pelt P, Zimmermann B, Ulbrich N, JP. Bernimoulin. Effects of lipopolysaccharide extracted from Prevotella intermedia on bone formation and on the release of osteolytic mediators by fetal mouse osteoblasts in vitro. Acrch Oral Biol 2002; 47(12): 859-866.

17. Sosroseno W, Bird PS, Seymour GJ. Nitric oxide production by a human osteoblast cell line stimulated with Aggregatibacter actinomycetemcomitans lipopolysaccharide. Oral Microbiol Immunol 2009; 24(1): 50-55.

18. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of ostepimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. J Oral Microbiol 2011; 3: 5304-5318.

19. Tripuwabhrut P, Mustafa K, Brudvik P, Mustafa M. Initial responses of osteoblasts derived from human alveolar bone to various compressive forces. Eur J Oral Sci 2012; 120(4): 311-318.

20. อินทราวงศ์เยาว์ฟ้า, นิรดา ธเนศวร, ชื่นชีวิต ทองศิริ. การตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูกจากกระดูกเบ้าฟันมนุษย์เมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของยีนอินเตอร์ลิวคิน 6 และผลต่อการทำงานของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส. การประชุมวิชาการระดับชาติเพื่อการพัฒนาด้านวิจัยอย่างยั่งยืน; 2555 25-26 ธันวาคม; กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 2555. 240-248.

21. Baggiolini M. Novel aspects of inflammation: interleukin-8 and related chemotactic cytokines. Clin Investig 1993; 71(10): 812-814.

22. Yang LC, Huang FM, Lin CS, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented Bacteroides in human pulp fibroblasts and osteoblasts. Int Endod J 2003; 36(11): 774-779.

23. Asano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Fujata S, Utsunomiya T, Yamamoto H, et al. IL-8 and MCP-1 inducd by excessive orthodontic force mediates odontogenesis in periodontal tissues. Oral Diseases 2011; 17(5): 489-498.

24. Shimauchi H, Takayama S, Narikawa-Kiji M, Shimabukuro Y, Okada H. Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. J Endod 2001; 27(12): 749-752.

25. Huang GTJ, Potente AP, Kim JW, Chugal N, Zhang X. Increased interleukin-8 expression in inflammed human dental pulps. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1999; 88: 214-220.

26. Lukic A, Vojvodic D, Majstorovic I, Colic M. Production of interleukin-8 in vitro by mononuclear cells isolated from human periapical lesions. Oral Microbiol Immunol 2006; 21(5): 296-300.

27. Hughes FJ, Aubin JE. Culture of cells of the osteoblast lineage. In: Arnett TR, B. H, editors. Methods in bone biology: Chapman&Hall 1997; p. 1-49.

28. Yamaji Y, Kobuta T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. Infect Immun 1995; 63(9): 3576-3581.

29. Herath TDK, Wang Y, Seneviratne CJ, Lu Q, Darveau RP, Wang CY, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts. J Clin Periodontol 2011; 38(8): 694-701.

30. Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T, Taketoshi Y, Tamura M, Takada H, et al. Interleukin-8 gene expression by human dental pulpfibroblast in cultures stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide. J Endodon 1996; 22(1): 9-12.

31. Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone rerosption is a mechanism for the increased osteolysis of metastasic bone disease. Bone 2003; 33(1): 28-37.

32. รุ่งทิวา ปันป่า, ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, นิรดา ธเนศวร. การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์ [วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท]. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ: กรุงเทพมหานคร; 2552.

33. Li B, Dong C, Wang G, Zheng H, Wang X, Bai C. Pulmonary epithelial CCR3 promotes LPS-induced lung inflammation by mediating release of IL-8. J Cell Physiol 2011; 226(9): 2398-2405.

ติดต่อบทความ:
ทันตแพทย์หญิง จรัสลักษณ์ สุขอวยชัย
กลุ่มงานบริการทันตสาธารณสุข 3 กองทันตสาธารณสุข
สำนักอนามัย ศูนย์บริการสาธารณสุข 10 ถนนสุขุมวิท
แขวงคลองตัน เขตคลองเตย กรุงเทพมหานคร 10110
โทรศัพท์ 02-258-4892
จดหมายอิเล็กทรอนิกส์ sjarasluck@gmail.com

Corresponding author:
Dr. Jarasluck Suk-auychai
Department of Dental Health Services 3,
Dental Health Division, Bureau of Health,
Health Center 10, Sukhumvit road, Klongton,
Klongtoey, Bankok 10110
Tel: 02-258-4892
Email: sjarasluck@gmail.com