

การแสดงผลของ CD156 ในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง  
**CD156 Expression in Gingival Tissue of Patients with Chronic Periodontitis**

มธุริน ใจหงษ์ (Maturin Jaihong)\* ดร.สาครรัตน์ คงขุนเทียน (Dr.Sakornrat Khongkhunthian)\*\*  
 ดร.พัทธินันท์ มนต์ริขจร (Dr.Pattanin Montreekachon)\*\*\* ดร.ชยารพ สุพรรณชาติ (Dr.Chayarop Supanchart)\*\*\*\*  
 ดร.ปริณา โชติจำลอง (Dr.Pareena Chotjumlong)\*\*\*\*\* ดร.ธนพัฒน์ ศาสตราวุจิ (Dr.Thanapat Sastrarujji)\*\*\*\*\*  
 ดร.สุทธิชัย กฤษณะประกกรกิจ (Dr.Suttichai Krisanaprakornkit)\*\*\*\*\*

**บทคัดย่อ**

CD156 เป็นไกลโคโปรตีนที่ทอดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดที่ 1 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลายชนิด มีการศึกษาพบว่าโรคปริทันต์จะมีระดับของ CD156 ในน้ำเหลืองเหงือกเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาในเนื้อเยื่อเหงือก การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจการแสดงออกของ CD156 ในเนื้อเยื่อเหงือก โดยศึกษาในเนื้อเยื่อเหงือกรอบฟันที่ถอนจากโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังและเนื้อเยื่อเหงือกปกติ กลุ่มละ 20 ตัวอย่าง แล้วตรวจด้วยวิธี RT-PCR และ real-time PCR เพื่อดูการแสดงออกในระดับ mRNA และ western blot เพื่อดูการแสดงออก ระดับโปรตีน พบว่าในเนื้อเยื่อเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังมีการแสดงออกของ CD156 มากกว่าเหงือกปกติ ทั้งในระดับ mRNA และ โปรตีน ( $p < 0.001$ ) สอดคล้องกับการศึกษาอื่นที่ศึกษาในน้ำเหลืองเหงือก อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ CD156 ต่อพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์ต่อไป

**ABSTRACT**

CD156, a transmembrane glycoprotein type 1, is associated with many diseases. Previous studies indicated that the levels of CD156 were elevated in gingival crevicular fluid (GCF) of patients with periodontal diseases according to disease severity. However, the expression in the gingival tissue has not yet been investigated. Therefore, the aims of the present study were to determine the expression of CD156 mRNA and protein in gingival biopsies of 20 patients with chronic periodontitis and 20 healthy volunteers by RT-PCR, real-time PCR and western blot analysis. The results revealed that both mRNA and protein levels of CD156 in chronic periodontitis groups were significantly greater than those of healthy gingiva ( $p < 0.001$ ). This finding was similar to the others in GCF. However, role of CD156 in pathogenesis of periodontal diseases should be further studied.

**คำสำคัญ:** CD156 เนื้อเยื่อเหงือก โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง

**Key Words:** CD156, Gingival tissue, Chronic periodontitis

---

\* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาปริทันต์วิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 \*\* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันต์วิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 \*\*\* อาจารย์ ภาควิชาทันตกรรมบูรณะและปริทันต์วิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 \*\*\*\* อาจารย์ ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 \*\*\*\*\* อาจารย์พิเศษ ศูนย์ความเป็นเลิศในด้านชีววิทยาช่องปาก กระดูกขากรรไกร และใบหน้า คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 \*\*\*\*\* ศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและวิทยาการวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**บทนำ**

โรคปริทันต์เป็นโรคที่มีการอักเสบและทำลายอวัยวะปริทันต์อันมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย ร่วมกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ร่างกายมีการผลิตไซโทไคน์และสารสื่อกลางการอักเสบ ส่งผลให้อวัยวะปริทันต์ถูกทำลาย โดยได้รับอิทธิพลจากพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมร่วมด้วย (Korhman, 2008)

ปัจจุบันมีการจำแนกโรคปริทันต์ออกเป็นหลายชนิด โดยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง (chronic periodontitis) เป็นโรคปริทันต์ที่พบได้บ่อย มีลักษณะที่สำคัญคือ มักพบในผู้ป่วยวัยผู้ใหญ่ มีระดับความรุนแรงของโรคหรือระดับการทำลายอวัยวะปริทันต์สัมพันธ์กับปัจจัยเฉพาะที่มีการดำเนินของโรคซ้ำถึงปานกลาง อาจพบว่ามีความสัมพันธ์กับปัจจัยเสริมเฉพาะที่ ผลจากการที่อวัยวะปริทันต์ถูกทำลายจะทำให้เกิดฟันโยก ฟันโยน มีปัญหาด้านความสวยงาม และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ต้องสูญเสียฟันไป (Armitage, 2004)

โรคปริทันต์อักเสบถือเป็นปัญหาสุขภาพช่องปากที่สำคัญของประเทศไทย จากรายงานการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากระดับประเทศ ครั้งที่ 7 ในปี พ.ศ. 2555 พบว่าประชากรวัยทำงานซึ่งมีอายุ 35-44 ปี เป็นโรคปริทันต์อักเสบที่มีการทำลายของกระดูกเบ้าฟันร่วมด้วยถึงร้อยละ 15.6 และพบความรุนแรงของโรคมากขึ้นในประชากรกลุ่มผู้สูงอายุ (กรมอนามัย, 2556)

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีการทำลายของกระดูกเบ้าฟัน จึงมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (osteoclasts) ซึ่งในการสลายกระดูกต้องอาศัยไซโทไคน์และปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง (Cochran, 2008; Schwartz et al., 1997) โดยมีการศึกษาพบว่า cluster of differentiation 156 (CD156) เป็นโมเลกุลชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในกระบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกในระยะสุดท้าย (Choi et al., 2001)

CD156 เป็นไกลโคโปรตีนที่ทอดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดที่ 1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 824 ตัว ที่มีการแสดงออกในเซลล์อักเสบหลายชนิด นอกจากนั้นยังพบในเซลล์สลายกระดูก โดยเฉพาะในเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast precursors) ที่อยู่ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงขั้นสุดท้าย (late stage of differentiation) อีกด้วย (Ishizuka et al., 2011)

Ainola et al. (2009) ได้ศึกษาบทบาทของ CD156 ต่อการเกิดโรครูมาตอยด์ ซึ่งเป็นโรคที่มีการอักเสบของข้ออย่างเรื้อรัง พบว่าระดับของ CD156 สูงขึ้นในผู้ป่วยโรครูมาตอยด์ ทั้งนี้โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีทั้งการอักเสบร่วมกับการทำลายกระดูกเช่นเดียวกับโรครูมาตอยด์ จึงเป็นที่น่าสนใจว่า CD156 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับทั้งเซลล์อักเสบและเซลล์สลายกระดูกอาจจะมีบทบาทเกี่ยวกับการเกิดโรคปริทันต์อักเสบด้วย จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของกลุ่มผู้วิจัยพบว่าระดับ CD156 ในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค (Khongkhunthian et al., 2013) แต่ยังไม่ปรากฏว่ามีการศึกษาถึงการแสดงออกของ CD156 ในเนื้อเยื่อปริทันต์รอบตัวฟันที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ จึงนำมาสู่แนวคิดในการศึกษาการแสดงออกของ CD156 ในเนื้อเยื่อปริทันต์ดังกล่าว

**วัตถุประสงค์การวิจัย**

เพื่อตรวจระดับการแสดงออกของ CD156 ในระดับ mRNA และโปรตีน ในเนื้อเยื่อเหงือกที่ได้จากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง และอาสาสมัครที่มีเหงือกปกติ

**วิธีการวิจัย**

**การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง**

คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจากผู้ที่มีการมารับการรักษาในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 40 คน ไม่จำกัดเพศและอายุ แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1) กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังตามการจำแนกของ AAP ปี 1999 (Armitage, 1999) จำนวน 20 คน เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปริทันต์รอบฟันที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังอย่างรุนแรง (severe chronic periodontitis) และจำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยการถอนฟัน โดยฟันซี่นั้นจะต้องมีความลึกของร่องลึกปริทันต์อย่างน้อย 6 มิลลิเมตร มีการสูญเสียอวัยวะปริทันต์โดยตรวจทางคลินิกและภาพรังสี และมีการพยากรณ์โรคอยู่ในระดับสิ้นหวัง (hopeless prognosis) (McGuire, Nunn, 1996)

2) กลุ่มผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดฟันกรามแท้ซี่ที่ 3 สี่ซีก จำนวน 20 คน เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติที่ปกคลุมฟันกรามแท้ซี่ที่ 3 ส่วนที่ติดกับฟันกรามแท้ซี่ที่ 2 ทั้งนี้ฟันกรามแท้ซี่ที่ 3 ต้องยังไม่ปรากฏขึ้นในช่องปาก มีกระดูกคลุมฟันทั้งซีกอย่างสมบูรณ์ และไม่มีประวัติการปวดและอักเสบ มีความลึกของร่องเหงือกไม่เกิน 3 มิลลิเมตร เหงือกปกติมีสีชมพูและไม่มีเลือดออกภายหลังการขยี้ร่องเหงือกด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์ (no bleeding on probing)

ผู้ป่วยที่ไม่นำมาศึกษา ได้แก่ ผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม โรครูมาตอยด์ และโรคกระดูกพรุน ผู้ป่วยที่ต้องได้รับยา ก่อนที่จะตรวจโดยใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์ ผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยยาสเตียรอยด์ ยาปฏิชีวนะ ยากลุ่มยากแก้ปวดชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ (NSAID) และยากคุมกำเนิดภายใน 3 เดือนที่ผ่านมา ผู้ป่วยโรคทางระบบและมีภาวะที่เป็นปัจจัยเสี่ยงของโรคปริทันต์อักเสบ ได้แก่ โรคเบาหวานและการสูบบุหรี่ รวมทั้งสตรีมีครรภ์หรืออยู่ในระหว่างให้นมบุตร

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติให้ทำการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิฯ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่แล้ว อาสาสมัครทุกคนให้ความยินยอมโดยการลงลายมือชื่อในเอกสารก่อนการศึกษา

## การเก็บตัวอย่าง

### กลุ่มเนื้อเยื่อเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

หลังจากถอนฟันที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังอย่างรุนแรงแล้ว ทำการกำจัดเนื้อเยื่อผิวมะระ (granulation tissue) ออกให้หมด แล้วจึงตัดชิ้นเนื้อเหงือกบริเวณที่ติดกับฟันนั้น โดยประกอบด้วยชั้นเยื่อผิว (epithelium) และชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ขนาด 3x3 มิลลิเมตร รวมจำนวน 20 ตัวอย่าง

### กลุ่มเนื้อเยื่อเหงือกปกติ

ก่อนการเปิดแผ่นเหงือกเพื่อนำฟันกรามแท้ซี่ที่ 3 ออก ทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกส่วนที่ปกคลุมด้านบนและติดกับฟันกรามแท้ซี่ที่ 2 โดยประกอบด้วยชั้นเยื่อผิวและชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ขนาด 3x3 มิลลิเมตร รวมจำนวน 20 ตัวอย่าง

ล้างเนื้อเยื่อทุกตัวอย่างด้วยน้ำเกลือแล้วนำไปใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเพื่อรอการสกัดแยก RNA และโปรตีนต่อไป

### การสกัดแยก total RNA และโปรตีนจากเนื้อเยื่อเหงือก

สกัดแยก mRNA และโปรตีน โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป total RNA and Protein Isolation (NucleoSpin® RNA/Protein) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตกำหนด มีวิธีโดยย่อคือ นำเนื้อเยื่อเหงือกที่เก็บในไนโตรเจนเหลวมาทุบให้แตกละเอียด จากนั้นเติมสารละลายผสมระหว่าง RP1 กับ  $\beta$ -mercapto-ethanol ลงไปเพื่อทำให้เซลล์แตก แล้วนำไปใส่ในหลอดสำหรับกรองและปั่นแยกสารละลายออกจากกัน จากนั้นเติม 350  $\mu$ L 70% ethanol เพื่อปรับสภาพการยัดจับของกรดนิวคลีอิกและปั่นต่อ ซึ่งจะทำได้ส่วนของกรดนิวคลีอิกที่สร้างพันธะอยู่กับเยื่อชั้นไขมัน และส่วนของสารละลายโปรตีนที่ผ่านเยื่อชั้นไขมันในหลอดทดลอง

ทำ RNA ให้บริสุทธิ์ โดยเริ่มจากนำกรดนิวคลีอิกซึ่งสร้างพันธะกับเยื่อชั้นไขมันมาล้างด้วย MDB และปั่นเพื่อละลายพันธะระหว่างกรดนิวคลีอิกกับเยื่อชั้นไขมัน เติม DNase แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อย่อยสลาย DNA ให้เหลือแต่ RNA จากนั้นล้างเยื่อ

กั้นชนิดอีกครั้งที่ 1 ด้วย RA2 ครั้งที่ 2 ด้วย RA3 แล้วนำไปปั่น จากนั้นจึงล้างครั้งที่ 3 ด้วย RA3 และปั่นต่อขั้นตอนสุดท้ายล้างด้วย H<sub>2</sub>O (RNase-free) แล้วนำไปปั่น จะได้สารละลาย total RNA ที่มีความบริสุทธิ์สูง

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ จะนำสารละลายโปรตีนที่แยกได้มาเติม protein precipitator buffer แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนโปรตีน แล้วเติม 50% ethanol และปั่นต่อก่อนนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที ขั้นตอนต่อมาเติม PSB-TCEP แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95-98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และสุดท้ายนำไปปั่นต่อ จะได้สารละลายโปรตีนที่พร้อมสำหรับนำไปทดสอบต่อไป

**การตรวจระดับการแสดงออกของ CD156 mRNA**

นำสารละลาย total RNA มาหาความเข้มข้นของสารละลายที่ได้จากเหงือกแต่ละชิ้นด้วยเครื่อง NanoDrop2000 spectrophotometer จากนั้นคำนวณปริมาณสารละลายที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ปริมาณของ total RNA จากเหงือกแต่ละชิ้นเท่าๆ กัน ตรวจการแสดงออกของ CD156 mRNA ด้วยวิธี RT-PCR และ Real-time PCR ดังวิธีที่อธิบายโดย Krisanaprakornkit et al. (2008)

**การตรวจระดับการแสดงออกของโปรตีน CD156**

นำสารละลายโปรตีนที่ได้จากเหงือกแต่ละชิ้นมาวัดความเข้มข้นด้วย protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) และอ่านค่า Optical density ที่ 540 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณปริมาตรของสารละลายเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนสุทธิ 40 ไมโครกรัมต่อชิ้นเนื้อเหงือกหนึ่งชิ้นไปเท่าๆ กัน ก่อนนำไปตรวจการแสดงออกของโปรตีน CD156 ด้วยวิธี western blot

**การวิเคราะห์ทางสถิติ**

ใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติ SPSS เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกระหว่าง 2 กลุ่ม โดยใช้ระดับนัยสำคัญที่  $p=0.05$

**ผลการศึกษา**

ผู้ป่วย 2 กลุ่มที่นำมาศึกษา (กลุ่มละ 20 คน) มีค่าเฉลี่ยอายุแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 1 และมีการกระจายของตำแหน่งฟันที่ทำการเก็บเนื้อเยื่อในทั้งขากรรไกรบนและล่าง ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 1** จำนวน เพศ และอายุเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง	เพศ (คน)		อายุเฉลี่ย (ปี)
	ชาย	หญิง	
เหงือกสุขภาพดี	5	15	19.9 ± 1.7
โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง	10	10	57.4 ± 8.6

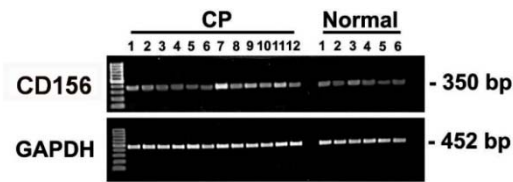
**ตารางที่ 2** จำนวนตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างในกลุ่มต่างๆ

ตัวอย่าง	ขากรรไกรบน	ขากรรไกรล่าง	ฟันหน้า/ฟันกราม/ฟันกรามน้อย	
			ฟันหน้า	ฟันกราม/ฟันกรามน้อย
เหงือกสุขภาพดี	10	10	20	0
โรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง	8	12	6	14

**ผลการตรวจ CD156 mRNA**

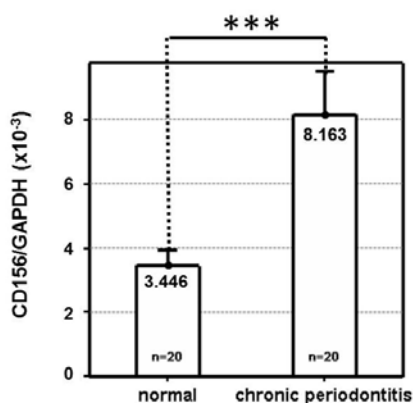
เมื่อทำการตรวจการแสดงออกของ CD156 mRNA ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ามีแถบผลิตภัณฑ์ใน 2 ตำแหน่ง คือ 350 และ 452 คู่เบส โดยตำแหน่ง 350 คู่เบส สอดคล้องกับขนาดของ CD156 mRNA ซึ่งแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังมีความเข้มที่แตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามแถบความเข้มของผลิตภัณฑ์ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ก็ยังมีค่าความเข้มมากกว่าแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเหงือกของอาสาสมัครที่เหงือกสุขภาพดี ในขณะที่ความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ในตำแหน่ง 452 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของ GAPDH mRNA ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมภายในมี

ความเข้มใกล้เคียงกัน แสดงถึงปริมาณ mRNA เริ่มต้นที่เท่ากัน (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงผลการศึกษาด้วยวิธี RT-PCR

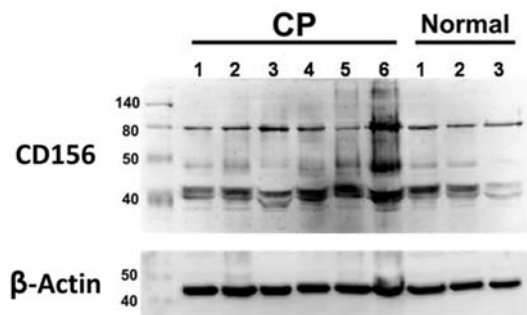
เมื่อตรวจด้วยวิธี real-time PCR พบว่าค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของ CD156 mRNA ในเนื้อเยื่อเหงือกของกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังเท่ากับ  $8.162 \times 10^{-3}$  เท่า (เมื่อเทียบกับการแสดงออกของ GAPDH mRNA) ขณะที่ค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของ CD156 mRNA ในเนื้อเยื่อเหงือกของกลุ่มอาสาสมัครที่เหงือกสุขภาพดีเท่ากับ  $3.446 \times 10^{-3}$  เท่า ซึ่งเมื่อพิจารณาการกระจายของข้อมูลพบว่าการกระจายแบบปกติจึงวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติแบบพาราเมตริกซ์ ชนิด unpaired t-test พบว่าในเนื้อเยื่อเหงือกที่ได้จากกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังมีการแสดงออกของ CD156 mRNA มากกว่าในเนื้อเยื่อเหงือกที่ได้จากกลุ่มอาสาสมัครที่เหงือกสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $***p < 0.001$  (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ระดับการแสดงออกของ CD156 mRNA เปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มด้วยสถิติแบบพาราเมตริกซ์ ชนิด unpaired t-test ที่  $***p < 0.001$

### ผลการตรวจโปรตีน CD156

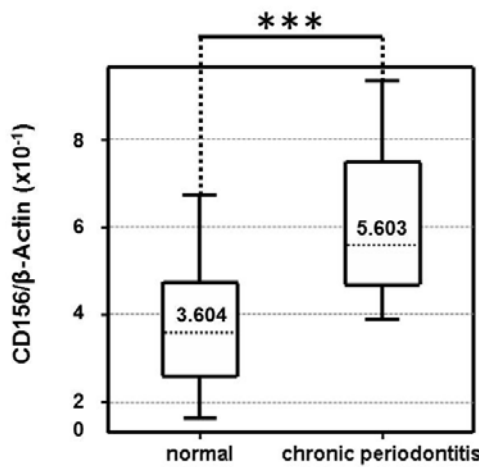
เมื่อตรวจการแสดงออกของโปรตีน CD156 ด้วยวิธี western blot พบว่ามีแถบผลิตภัณฑ์ปรากฏขึ้นหลายตำแหน่งคือ ตำแหน่ง 89, 50 และมากกว่า 40 กิโลดาลตัน โดยตำแหน่ง 89 กิโลดาลตันมีขนาดสอดคล้องกับขนาดของโปรตีน CD156 ส่วนแถบผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 50 และมากกว่า 40 กิโลดาลตัน อาจจะเป็นโปรตีน CD156 ที่มีขนาดเล็กลงหลังจากถูกย่อยสลาย ซึ่งแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเข้มแตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง มีความเข้มมากกว่าเนื้อเยื่อเหงือกสุขภาพดี ในขณะที่ความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ในตำแหน่ง 42 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีน  $\beta$ -Actin (โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมภายใน) มีความเข้มใกล้เคียงกัน แสดงถึงปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่เท่ากัน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แถบผลิตภัณฑ์โปรตีน CD156 ที่ถูกแยกด้วยวิธี western blot

เมื่อวัดความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้พบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน CD156 ในเนื้อเยื่อเหงือกของกลุ่มโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังเท่ากับ 0.56 เท่า (เมื่อเทียบกับ  $\beta$ -Actin) ขณะที่เนื้อเยื่อเหงือกของกลุ่มเหงือกสุขภาพดีเท่ากับ 0.36 เท่า ซึ่งเมื่อคำนวณด้วยสถิติแบบพาราเมตริกซ์ พบว่าในเนื้อเยื่อเหงือกที่ได้จากกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังมีการแสดงออกของโปรตีน CD156 มากกว่าใน

เนื้อเยื่อเหงือกที่ได้จากกลุ่มอาสาสมัครที่เหงือกสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $***p < 0.001$  (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ระดับการแสดงออกของโปรตีน CD156 เปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มด้วยสถิติแบบนอนพารามตริกซ์ ที่  $***p < 0.001$

#### วิเคราะห์และสรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ทำการศึกษา ระดับการแสดงออกของ CD156 ในเนื้อเยื่อเหงือก โดยในการศึกษาของ Khongkhunthian et al. (2013) เป็นการศึกษาในน้ำเหลืองเหงือก อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของ CD156 ในการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา นั่นคือ ในกลุ่มโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังจะมีการแสดงออกของ CD156 มากกว่าในกลุ่มเหงือกสุขภาพดี

การศึกษานี้ตรวจสอบการแสดงออกทั้งในระดับ mRNA และ โปรตีนเนื่องจากต้องการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากทั้งกระบวนการถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation) ซึ่งผลที่ได้พบว่า CD156 มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังมากกว่าทั้งในระดับ mRNA และ โปรตีน ซึ่งอาจเกิดจาก

1. ในเนื้อเยื่อที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบมีเซลล์อักเสบอยู่จำนวนมาก (Page, Schroeder, 1976) ซึ่งเซลล์บางชนิดสามารถสร้าง CD156 ได้ (Yoshiyama et al., 1997; Richens et al., 2007)

2. ในเนื้อเยื่อเหงือกซึ่งประกอบด้วยชั้นเยื่อบุผิว และชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งอาจมีเซลล์ที่สามารถสร้าง CD156 ได้เมื่อถูกกระตุ้นจากสารสื่อกลางการอักเสบบางชนิด

กลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 มีอายุที่ต่างกัน เนื่องจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง ความรุนแรงของโรคและอายุจะแปรผันตามกัน (Van der Velden, 1984) ส่วนกลุ่มอาสาสมัครที่เหงือกสุขภาพดี จะมีอายุน้อยกว่าเนื่องจากเป็นผู้ป่วยที่มาเพื่อผ่าฟันคุดที่ยังไม่ขึ้นในช่องปาก และมีกระดูกคุดอย่างสมบูรณ์ ซึ่งโดยปกติแล้วในผู้ป่วยที่อายุมากแม้จะมีฟันคุดชนิดนี้ถ้าไม่มีอาการผิดปกติใดๆ ก็ไม่นิยมให้ผ่าตัดออก จึงเป็นข้อจำกัดของการศึกษานี้ (ถ้าสามารถหาผู้สูงอายุที่มีเหงือกสุขภาพดี และสามารถเก็บชิ้นเนื้อได้ หรืออาจเลือกผู้ป่วยที่อายุระหว่าง 35-45 ปีที่มีฟันคุดชนิดที่มีกระดูกคุด โดยสมบูรณ์และต้องการผ่าตัดออก ก็จะสามารถตัดปัจจัยเรื่องอายุที่แตกต่างกันได้ แต่ด้วยเวลาที่จำกัดจึงไม่สามารถหาตัวอย่างกลุ่มนี้ได้)

ในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นอาสาสมัครที่เหงือกสุขภาพดีมีจำนวนเพศหญิงมากกว่าเพศชาย อย่างไรก็ตามจากการคำนวณทางสถิติพบว่า การแสดงออกของ CD156 ในอาสาสมัครกลุ่มนี้ที่เป็นเพศหญิงไม่แตกต่างจากเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทั้งในระดับ mRNA และ โปรตีน จึงอาจกล่าวได้ว่าปัจจัยเรื่องเพศไม่ส่งผลต่อผลการศึกษานี้

การควบคุมการตัดชิ้นเหงือกให้มีขนาดเท่ากันทำได้ยากแม้จะพยายามตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้ทำการควบคุมโดยตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลาย total mRNA และ โปรตีนที่สกัดได้จากเหงือกแต่ละชิ้น จากนั้นจึงคำนวณปริมาณสารที่จะใช้เพื่อให้ได้ปริมาณ total mRNA และ โปรตีนที่เท่ากัน ก่อนนำมาตรวจสอบการแสดงออกของ CD156 mRNA และ โปรตีน

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบตัดขวาง (cross-sectional study) ผลการศึกษาจึงบอกได้เพียงว่า ในเนื้อเยื่อเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบมีการแสดงออกของ CD156 ทั้งในระดับ mRNA และ โปรตีนมากกว่าในเนื้อเยื่อเหงือกที่สุขภาพดี แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าการมี CD156 มีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อย่างไร จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าในเนื้อเยื่อเหงือกที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังมีระดับการแสดงออกของ CD156 มากกว่าในเนื้อเยื่อเหงือกที่มีสุขภาพดีทั้งในระดับ mRNA และ โปรตีน

#### กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศในด้านชีววิทยาของปาก กระดูกขากรรไกร และใบหน้า และงบประมาณสนับสนุนงานวิจัยของนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

#### เอกสารอ้างอิง

กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. รายงานสรุปการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากระดับประเทศ ครั้งที่ 7 ประเทศไทย พ.ศ. 2555. กรุงเทพฯ:2556.

Ainola M, Li TF, Mandelin J, Hukkanen M, Choi SJ, Salo J, Konttinen YT. Involvement of a disintegrin and a metalloproteinase 8 (ADAM 8) in osteoclastogenesis and pathological bone destruction. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 427-434.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4(1): 1-6.

Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases 2004. *Periodontol* 2000 2004; 34: 9-21.

Choi SJ, Han JH, Roodman GD. ADAM8: a novel osteoclast stimulating factor. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 814-822.

Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol* 2008; 79(8 Suppl): 1569-1576.

Ishizuka H, Garcia-Palacios V, Lu G, Subler MA, Zhang H, Boykin CS, Choi SJ, Zhao L, Patrene K, Galson DL, Blair HC, Hadi TM, Windle JJ, Kurihara N, Roodman GD. ADAM8 enhances osteoclast precursor fusion and osteoclast formation in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 2011; 26(1): 169-181.

McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. II. The effectiveness of clinical parameters in developing an accurate prognosis. *J Periodontol* 1996; 67(7): 658-665.

Khongkhunthian S, Techasatian P, Supanchart C, Bandhaya P, Montreekachon P, Thawanaphong S, Krisanaprakornkit S. Elevated levels of a disintegrin and metalloproteinase 8 in gingival crevicular fluid of patients with periodontal diseases. *J Periodontol* 2013; 84(4): 520-528.

Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J periodontol* 2008; 79(8 Suppl): 1560-1568.

Krisanaprakornkit S, Chotjumlong P, Kongtawelert P, Reutrakul V. Involvement of phospholipase D in regulating expression of antimicrobial peptide human  $\beta$ - defensin-2. *Int immunol* 2008; 20(1): 21-29.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease, A summary of current work. Lab invest 1976; 34(3); 235-249.

Richens J, Fairclough L, Ghaemmaghami AM, Mahdavi J, Shakib F, Sewell HF. The detection of ADAM8 protein on cells of the human immune system and the demonstration of its expression on peripheral blood B cell, dendritic cells and monocyte subsets. Immunobiology 2007; 212(1); 29-38.

Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. Periodontol 2000 1997; 14: 158-172.

Van der Velden U. Effect of age on the periodontium. J Clin Periodontol 1984; 11(5): 281-294.

Yoshiyama K, Higuchi Y, Kataoka M, Matsuura K, Yamamoto S. CD156 (human ADAM8): expression, primary amino acid sequence, and gene location. Genomics 1997; 41(1): 56-62.