

บทคัดย่อ

โรคปริทันต์เป็นโรคประกอบขึ้นจากหลายเหตุปัจจัย โดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (แอลพีเอส) เป็นปัจจัยหลักอันหนึ่งของการเกิดและการดำเนินไปของโรค แอลพีเอสจากแบคทีเรียเอสเชอริเชียโคไลถูกนำมาใช้ ในการศึกษาผลของแอลพีเอสมาเป็นระยะเวลาหลายสิบปี เนื่องจากมีส่วนของโครงสร้างที่พบได้ในเอนโดทอกซินของแบคทีเรียแกรมลบทุกชนิด อย่างไรก็ตามการศึกษาในแอลพีเอสที่ได้จากพอไฟโรโมแนสจินจิออลิส ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคปริทันต์ให้ผลการศึกษาที่ต่างไปจากผลที่ได้จากเอสเชอริเชียโคไลแอลพีเอส นอกเหนือจากปัจจัยทางชีวภาพแล้ว พบว่าปัจจัยทางกายภาพก็มีผลต่อการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของเซลล์ เนื่องจากภายในช่องปากมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิบ่อยครั้ง อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิร่างกาย อาจส่งผลกระทบต่อสภาวะของโรคปริทันต์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของแอลพีเอสที่ได้จากพอไฟโรโมแนสจินจิออลิสกับเอสเชอริเชียโคไล และผลของความร้อนต่อระดับการแสดงออกของทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟา (ทีเอ็นเอฟอัลฟา) ในไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ ในแง่ของตัวรับรู้และการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ ศึกษาโดยเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ แล้วกระตุ้นเซลล์ด้วยพอไฟโรโมแนสจินจิออลิสแอลพีเอส เอสเชอริเชียโคไลแอลพีเอส หรือเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สำหรับการกระตุ้นด้วยความร้อน การเปลี่ยนแปลงของทีเอ็นเอฟอัลฟาในระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัส และโปรตีน วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ และอีไลซา ส่วนการส่งถ่ายสัญญาณในเซลล์ ศึกษาโดย ในระดับตัวรับรู้ของเซลล์ใช้แอนติบอดีตัวยับยั้งร่วมกับเทคนิคเอสไออาร์เอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อตัวรับรู้แอลพีเอสของเซลล์คือ โทลโลครีเซปเตอร์ 2 และ 4 เพื่อหาตัวรับรู้ที่เซลล์แต่ละชนิดใช้ และต่อชนิดของแอลพีเอสที่เซลล์รับรู้ ส่วนในการส่งถ่ายสัญญาณในเซลล์ ใช้ตัวยับยั้งที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลที่ส่งถ่ายสัญญาณ ผลการศึกษาพบว่าทั้งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์สามารถรับรู้แอลพีเอสทั้งสองชนิดได้โดยใช้โทลโลครีเซปเตอร์ 2 หรือ 4 เพียงตัวใดตัวหนึ่งซึ่งส่งผลในการเพิ่มการแสดงออกของทีเอ็นเอฟอัลฟา เส้นทางการส่งถ่ายสัญญาณในเซลล์พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเอ็นยึดปริทันต์เมื่อกระตุ้นด้วยพอไฟโรโมแนสจินจิออลิสแอลพีเอสจะผ่านไปทางพีไอทรีเค และ เอเคที แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอสเชอริเชียโคไลแอลพีเอสจะผ่านไปทางเอเคทีและเอิร์ค ส่วนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกเมื่อกระตุ้นด้วยพอไฟโรโมแนสจินจิออลิสแอลพีเอสจะผ่านไปทางเอิร์ค พี38ไคเนส และเอ็นเอฟแคปปาบี แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอสเชอริเชียโคไลแอลพีเอสจะผ่านไปทางเอ็นเอฟแคปปาบีเท่านั้น สำหรับความร้อนนั้นเซลล์รับรู้ผ่านทางตัวรับรู้ทรีบี-1 โดยส่งถ่ายสัญญาณไปทาง พีเคซี การใช้ไซโตคาลาซินดี ซึ่งยับยั้งการเกิดแอกตินโพลีเมอร์ ทำให้ทราบว่า การจัดเรียงตัวใหม่ของโครงร่างภายในของเซลล์อาจมีความสำคัญในกลไกการรับรู้ความร้อนของเซลล์ โดยสรุปจากข้อมูลข้างต้นพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีกลไกการตอบสนองต่อพอไฟโรโมแนสจินจิออลิส และเอส เอสเชอริเชียโคไลแอลพีเอสในการเพิ่มการสร้างทีเอ็นเอฟอัลฟาต่างกัน ส่วนการตอบสนองของเซลล์ต่อความร้อนโดยรับรู้ผ่านทรีบี-1 แสดงให้เห็นว่าความร้อนน่าจะมีบทบาทในรอยโรคปริทันต์

Abstract

Periodontal disease is the multifactor disease. Lipopolysaccharide (LPS) has been shown as a major pathogenic substance. LPS derived from *E. coli* has been used to study for several decades according to its well-conserved structure typical for bacterial endotoxin, however, increasing information retrieve from using LPS derived from *P. gingivalis*, which is recognized as a main pathogenic bacteria causing of periodontitis have shown different from that of *E. coli*. In addition to biological factor, physical factor may partially responsible for modulation of cell behavior. Oral cavity is often exposed to the change in temperature. Higher temperature above the body temperature may cause some effects on periodontal disease. The purpose of the present study was to investigate the effect of LPS; compared between that derived from *P. gingivalis* and *E. coli*, and the physical environment; heat, on the expression of TNF α in human gingival and periodontal ligament fibroblasts in aspects of receptors and the intracellular signal transduction pathways. In the study, primary cultures of healthy gingival and periodontal ligament fibroblasts were treated with *P. gingivalis*/ *E. coli* LPS or incubated at 45°C for thermal stimulation. Changes of TNF α at the levels of mRNA and protein were determined by using RT-PCR and ELISA. To elucidate the signal transduction pathway of *P. gingivalis*/ *E. coli* LPS and heat-induced TNF α , blocking anti-TLRs and TLRs siRNA were used to specify the required receptors. In addition, specific inhibitors of the intracellular signaling molecules were used to analyze the regulatory pathways. The result demonstrated that both PDL and GF cells could recognize both kinds of LPS by using either TLR2 or TLR4, but with the different extend, to induce TNF α expression. However, signaling pathway in *P. gingivalis* LPS treated-PDL cells was passed through PI3K and Akt, whereas the pathway in *E. coli* LPS treated-PDL cells was via Akt and ERK. While pathway in *P. gingivalis* LPS treated-GF cells was through ERK, p38 kinase and NF-kB, whereas the pathway in *E. coli* LPS treated-GF cells was via NF-kB only. Heat up-regulated TNF α was mediated by TRPV1. PKC was required for heat-induced TNF α expression. In addition, the use of Cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization, revealed that the cytoskeleton rearrangement might be an important mechanism for cellular sensing of thermal stimuli. In conclusion, all above the results suggest that *P. gingivalis* LPS differs from *E. coli* LPS in its signaling pathway in PDL and GF cells, and both types of cells responded to LPS using the different pathway to up-regulate TNF α . Thermal stimulated-TRPV1 activation led to the induction of TNF α mRNA expression in PDL cells suggesting role of heat in modulating of periodontal disease.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
สารบัญเรื่อง	iii
สารบัญภาพ	iv
คำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vii
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	14
ผลการวิจัย	18
วิจารณ์และสรุป	31
บรรณานุกรม	36
ประวัติคณະนักวิจัย	44
ผลงานที่ได้อันเนื่องมาจากงานวิจัย	45

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของ TNFα ใน PDL ใน A. ระดับ mRNA และ B. จำนวนเท่า (fold) ของระดับโปรตีน และระดับการแสดงออกของ TNFα ใน GF C. ระดับ mRNA และ B. จำนวนเท่า (fold) ของระดับโปรตีนเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย <i>Pg</i> และ <i>E. coli</i> LPS วิเคราะห์โดยเทคนิค RT-PCR และ ELISA	18
รูปที่ 2 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNFα โดยแสดง เทียบกับระดับการแสดงออกของ GAPDH ซึ่งเป็น internal control ในเซลล์ PDL (A) และ GF (B) เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย <i>Pg</i> และ <i>E. coli</i> LPS ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml ในสภาวะที่มี specific blocking antibodies ต่อ TLR2 และ TLR4 (TLR2 และ TLR4 Blockers)	19
รูปที่ 3 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNFα TLR2 และ TLR4 ในเซลล์ A. PDL และ B. GF เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย <i>Pg</i> และ <i>E. coli</i> LPS ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml ในสภาวะที่มี siRNA ต่อ TLR2 และ TLR4 (siTLR2, siTLR4)	21
รูปที่ 4 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNFα, TLR2 และ TLR4 ใน A. PDL และ B. GF เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย <i>Pg</i> และ <i>E. coli</i> LPS ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	23
รูปที่ 5 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNFα และ GAPDH ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับตัวยับยั้งการทำงานของ (inhibitors) ของ PI3K, Akt, ERK, JNK, p38 kinase, และ NF-κB เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนที่จะกระตุ้น เซลล์ด้วย <i>Pg</i> หรือ <i>E. coli</i> LPS ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml ต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	24

หน้า

- รูปที่ 6** แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α และ GAPDH ในเซลล์ GF เมื่อได้รับตัวยับยั้งการทำงาน (inhibitors) ของ PI3K, Akt, ERK, JNK, p38 kinase, และ NF-kB เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนที่จะกระตุ้นเซลล์ด้วย *Pg* หรือ *E. coli* LPS ที่ความเข้มข้น 10 ug/ml ต่ออีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 25
- รูปที่ 7** แสดงผลของความร้อนต่อการมีชีวิตของเซลล์ PDL โดยนำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 60 นาที และ 120 นาที จากนั้นทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay 26
- รูปที่ 8** แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α , IL-1 β และ HSP70 ในเซลล์ PDL ของมนุษย์ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลาต่างๆ 26
- รูปที่ 9** แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL เซลล์ GF และเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) ของมนุษย์ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 27
- รูปที่ 10** แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C ในสภาวะที่มี cyclohexamide (CHX) 1 ug/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 28
- รูปที่ 11** แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C ในสภาวะที่มี capsazepine (CPZ) 10 uM หรือ Ruthenium Red (RR) 10 uM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 28

หน้า

- รูปที่ 12** แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α
 ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C
 ในสภาวะที่มี EGTA 1 μ M หรือ ในสภาวะที่ไม่มีแคลเซียมใน
 อาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 29
- รูปที่ 13** แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α
 ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C
 ในสภาวะที่มี staurosporine 0.1 μ M และ 0.5 μ M เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 29
- รูปที่ 14** แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α
 ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C
 ในสภาวะที่มี U-73122 (2 μ M) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30
- รูปที่ 15** แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของ TNF α
 ในเซลล์ PDL เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C
 ในสภาวะที่มี cytochalasin D (100 nM) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30

คำย่อที่ใช้ในการวิจัย

Akt	protein kinase B
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GF	human gingival fibroblast
HSP	heat shock proteins
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LPS	lipopolysaccharides
NF- κ B	nuclear factor kappa-B
PDL	human periodontal ligament fibroblast
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
p38MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
siRNA	small interfering RNA
TLR	toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TRPV1	transient receptor potential vanilloid-1