บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่ RSA5680010

ชื่อโครงการ ผลของจินจิเพนต่อการแสดงออกของทรีฟอยล์แฟคเตอร์สาม

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.ทันตแพทย์ พลธรรม ไชยฤทธิ์

อีเมล์ cponla@kku.ac.th

ระยะเวลาการดำเนินงาน 3 ปี (มิถุนายน 2556-พฤษภาคม 2558)

วัตถุประสงค์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของจินจิเพนต่อการแสดงออกของทรีฟอยล์แฟคเตอร์สาม วัตถุประสงค์ในระดับโมเลกุลเพื่อประเมินผลการย่อยสลายโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามด้วยเอนไซม์จินจิเพน วัตถุประสงค์ในระดับเซลล์เพื่อประเมินผลการยับยั้งการแสดงออกของทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามในเซลล์จากเนื้อเยื่อบุเหงือกด้วยเอนไซม์จินจิเพน วัตถุประสงค์ในระดับคลินิกเพื่อประเมินระดับโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามและเอนไซม์จินจิเพนในน้ำลายผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบก่อนทำการรักษาและภายหลังการรักษาโรคปริทันต์

วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

เครื่องวัดมวลสารแมส-สเปคโตรเมตทรีถูกใช้เพื่อประเมินผลการย่อยสลายโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามด้วยเอนไซม์จินจิเพน เรียลไทม์อาร์ทีพีซีอาร์และเวสเทิร์นบลอทถูกใช้เพื่อประเมินผลการยับยั้งการแสดงออกของทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามในเซลล์จากเนื้อเยื่อบุเหงือกด้วยเอนไซม์จินจิเพน อีไลซ่าถูกใช้เพื่อวัดระดับโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามและเอนไซม์จินจิเพนในน้ำลายผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบก่อนทำการรักษาและภายหลังการรักษาโรคปริทันต์ เรียลไทม์ทีพีซีอาร์ถูกใช้เพื่อวัดปริมาณเชื้อพีจินจิวาริส

ผลการศึกษา

การศึกษาในระดับโมเลกุลแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จินจิเพนสามารถย่อยสลายโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สาม คณะผู้วิจัยพบว่าเครื่องวัดมวลสารชนิดมัลดิทอฟ-ทอฟ สามารถใช้ประเมินรูปแบบการย่อยสลายโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามด้วยเอนไซม์จินจิเพนแต่ไม่สามารถระบุชัดเจนถึงชิ้นส่วนของโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามที่ถูกย่อยสลายมีลำดับกรดอะมิโนอะไรบ้าง ในการระบุลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วนโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามที่ถูกย่อยสลายคณะผู้วิจัยเลือกใช้เครื่องวัดมวลสารชนิดแอลซีเอ็มเอสและพบว่าเอนไซม์จินจิเพนสามารถย่อยสลายโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามในบริเวณที่เป็นทรีฟอยล์แฟคเตอร์โดเมน ผลการศึกษาสอดคล้องกับสมมุติฐานที่ได้ตั้งไว้ สำหรับข้อพิจารณาทางคลินิกมีประเด็นที่น่าสนใจสำหรับการทำวิจัยต่อไปคือภาวะในช่องปากซึ่งมีน้ำลายเป็นองค์ประกอบที่สำคัญเอนไซม์จินจิเพนจะย่อยสลายโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามได้หรือไม่ สำหรับการศึกษาในระดับเซลล์คณะผู้วิจัยพบว่าเอนไซม์จินจิเพนยับยั้งการแสดงออกของเอ็มอาร์เอนเอของยีนทรีฟอยล์แฟคเตอร์สาม

ในเซลล์จากเนื้อเยื่อบุเหงือกโดยการยับยั้งนี้เกิดขึ้นที่บางความเข้มข้นของเอนไซม์จินจิเพนและผลการยับยั้งของเอนไซม์จินจิเพนไม่ได้เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์เนื่องจากไม่ปรากฏการแสดงออกของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ ได้แก่ คลิฟพาร์พและเคสเปสสาม ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับสมมุติฐานที่ได้ตั้งไว้ สำหรับการศึกษาในระดับคลินิกคณะผู้วิจัยพบว่าก่อนการรักษาโรคปริทันต์ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมีระดับของโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามและเอนไซม์จินจิเพนในน้ำลายต่ำกว่าอาสาสมัครกลุ่มควบคุม ภายหลังการรักษาโรคปริทันต์เสร็จแล้วผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมีระดับของโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามลดลงแต่ระดับเอนไซม์จินจิเพนไม่แตกต่างจากเอนไซม์จินจิเพนก่อนที่ผู้ป่วยได้รับการรักษา นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบการมีอยู่ของเชื้อพีจินจิวาริสในน้ำลายของผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบและในน้ำลายของอาสาสมัครกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาในระดับคลินิกไม่สอดคล้องกับสมมุติฐานที่ตั้งไว้โดยแสดงให้เห็นว่าการรักษาโรคปริทันต์อักเสบไม่มีผลต่อการเพิ่มระดับของโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามหรือลดระดับเอนไซม์จินจิเพนในน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ

บทสรุปและวิจารณ์

จากผลการศึกษาตามวัตถุประสงค์ข้อแรกคณะผู้วิจัยพบว่าเอนไซม์จินจิเพนสามารถย่อยสลายโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามและผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติมและพบว่าเอนไซม์จินจิเพนสามารถย่อยสลายโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์หนึ่งและสองได้เช่นกัน ข้อมูลที่ได้ทั้งสองส่วนถูกใช้ในการเตรียมบทความต้นฉบับ(ตามเอกสารแนบโปรดดูในภาคผนวก) จากผลการศึกษาตามวัตถุประสงค์ข้อที่สองคณะผู้วิจัยพบว่าเอนไซม์จินจิเพนสามารถยับยั้งการแสดงออกของเอ็มอาร์เอนเอของยีนทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามในเซลล์จากเนื้อเยื่อบุเหงือกโดยการยับยั้งนี้ไม่ได้เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยต้องการที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้มาซึ่งคำอธิบายเกี่ยวกับกลไกที่เอนไซม์จินจิเพนใช้ยับยั้งการแสดงออกของเอ็มอาร์เอนเอของยีนทรีฟอยล์แฟคเตอร์สาม จากผลการศึกษาตามวัตถุประสงค์ข้อที่สามคณะผู้วิจัยพบว่าเชื้อพีจินจิวาริสในน้ำลายของผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบและในน้ำลายของอาสาสมัครกลุ่มควบคุมและการรักษาโรคปริทันต์อักเสบไม่มีผลต่อการเพิ่มระดับของโมเลกุลทรีฟอยล์แฟคเตอร์สามหรือลดระดับเอนไซม์จินจิเพนในน้ำลายของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบดังนั้นการศึกษาต่อไปที่น่าสนใจคือการศึกษาบทบาทของเชื้อพีจินจิวาริสในน้ำลายจะแตกต่างจากเชื้อพีจินจิวาริสในร่องเหงือกและกระเป๋าปริทันต์ของผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบและผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบหรือไม่

คำหลัก จินจิเพน; ผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ; น้ำลาย; ทรีฟอยล์แฟคเตอร์

Abstract

Project Code : RSA5680010

Project Title : Effects of gingipains on expression of trefoil factor 3

Investigator : Associate Professor Dr. Ponlatham Chaiyarit

E-mail Address : cponla@kku.ac.th

Project Period : 3 years (June 2014-May 2016)

Objectives: The present study was aimed to determine the effects of gingipains on trefoil factor 3 (TFF3). At the molecular level, the objective was to investigate the proteolytic activity of gingipains on degradation of TFF3 peptides. At the cellular level, the objective was to investigate the inhibitory activity of gingipain on expression of TFF3 in primary cultured human gingival epithelial cells. At the clinical level, the objective was to investigate levels of TFF3 and gingipains in saliva from chronic periodontitis patients before, and after periodontal disease treatments.

Materials and Methods: The proteolytic effect of gingipains on TFF3 was determined by mass spectrometry (MS). The inhibitory effect of gingipain on expression of TFF3 in primary cultured human gingival epithelial cells was evaluated by real-time RT-PCR and Western blotting techniques. Levels of TFF3 and gingipains in saliva from chronic periodontitis patients before and after periodontal treatments were measured by ELISA. Number of *P.gingivalis* was evaluated by real time PCR.

Results: At the molecular study level, our observations provided new information that gingipains were able to digest human TFF3 peptides. MALDI-TOF/TOF MS could be used for evaluating patterns of TFF3 digestion by gingipains but not for identification of digested TFF3 fragments. LC-MS could identify digested TFF fragments. At the cellular study level, our findings demonstrated that gingipains inhibited the expression of TFF3 mRNA, and inhibited the expression of TFF3 peptides with a dose response manner in human gingival epithelial cells. To verify whether the reduction of *TFF3* mRNA expression is related to the apoptotic effects by gingipains, expression of apoptotic marker molecules such as cleaved PARP and caspase 3 were measured, using Western blotting technique. No detectable levels of these two apoptotic markers were observed from HGEP treated cells. These findings suggest that reduction of TFF3 mRNA was not influenced by apoptotic effects of gingipains. At the clinical study level, we observed that levels of salivary TFF3 and gingipains (RgpB) were significantly reduced in chronic periodontitis patients before periodontal treatment, compared with the control group.

Levels of salivary TFF3 in chronic periodontitis patients were also decreased after periodontal treatment, whereas salivary gingipains were not decreased. Our observations demonstrated that the presence of *P. gingivalis* could be detected in whole saliva samples of periodontally healthy, gingivitis, and periodontitis patients. Our findings demonstrated that periodontal treatments did not affect the levels of salivary RgpB in periodontitis and non-periodontitis subjects.

Conclusion and discussion: Regarding the first objective, we confirm the proteolytic activity of gingipains on degradation of TFF3 peptides. We also performed additional experiments by investigating the proteolytic effects of gingipains on TFF1 and TFF2 peptides. These results were combined with the findings from this present study for preparation of the first manuscript (please see the attached document in the appendix). Regarding the second objective, we confirm that the inhibitory activity of gingipains on expression of TFF3 mRNA in primary cultured human gingival epithelial cells is not influenced by an apoptotic mechanism. However, further experiments are needed to clarify how gingipains down-regulates the expression of TFF3. Regarding third objective, we demonstrate that periodontal treatments do not affect the levels of salivary TFF3 and RgpB in periodontitis and non-periodontitis subjects. In addition, we confirm the presence of *P. gingivalis* in whole saliva samples of periodontally healthy, gingivitis, and periodontitis patients. Thus, it would be of interest to do real time PCR to measure of number of *P. gingivalis* in whole saliva as compared with those in the periodontal pockets. Moreover, further studies are needed to identify the exact molecular mechanism of the regulation of TFF expression in response to chronic inflammation by periodontopathic bacteria.

Keywords : gingipains; periodontitis; saliva; trefoil factor