รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของเอชเอ็มจีบี-1ต่อการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเอตร์ แอลฟาอินเตอร์ลิวคิน 1 เบต้าและเอ็มเอ็มพี-1ในเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์

Effect og HMGB1 in TNF-α , LI1β and MMP1 on human gingival and periodontal ligament fibroblast.

ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้บัณฑิตวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ2554

สัญญาวิจัย เลขที่ 224/2554

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
บทที่ 1 บทนำ	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยเกี่ยวข้อง	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	17
บทที่ 4 ผลการวิจัย	24
บทที่ 5 อภิปรายผลและบทสรุป	31
การอ้างอิง	35
ประวัติย่อผู้วิจัย	41

บทคัดย่อ

เอชเอ็มจีบี1เป็นโปรตีนที่พบในนิวเคลียส เมื่อถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์จะสามารถทำหน้าที่เสมือนไซโตไคน์ได้ ถูกพบในรอยโรคหลายชนิด เช่น รูมาตอยด์ และพบในน้ำเหลืองเหงือกและเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ และยังพบการแสดงออกของยีน และการหลั่งเอชเอ็มจีบี1หลังกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 จึงอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาบทบาทของเอชเอ็มจีบี1ต่อการแสดงออกของยีนและการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ เมื่อกระตุ้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดด้วยเอชเอ็มจีบี1ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เปรียบเทียบกับกระตุ้นด้วยสารตัวใดตัวหนึ่งเพียงอย่างเดียว

วิธีดำเนินการวิจัย เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิดจากเนื้อเยื่อของฟันที่ไม่แสดงรอยโรคของการอักเสบจากผู้ป่วย 2 ราย กระตุ้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 ไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และสภาวะไม่ได้กระตุ้น ตรวจสอบการแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีเรียลไทม์ พีซีอาร์ที่ 4 ชั่วโมง และนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกระตุ้นเซลล์ 48 ชั่วโมง มาตรวจสอบหาปริมาณทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ด้วยเทคนิคอีไลซ่า และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของความเข้มข้นทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน1 เบต้า และเมทิกเมทัลโลโปรตีเนส-1 ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวและเปรียบเทียบรายคู่ด้วยสถิติแบบทีและวิเคราะห์การแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอด้วยสถิติพรรณา

ผลการวิจัย เซลล์ทั้ง 2 ชนิดมีการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดร่วมกันมากกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และเซลล์ทั้ง 2 ชนิดเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสจะมีการหลั่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดออกมามากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มเอชเอ็มจีบี1อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ส่วนการแสดงออกของยีนทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าพบว่าเซลล์ทั้ง 2 ชนิดมีการแสดงออกที่ไม่สัมพันธ์กับการหลั่งโปรตีน อย่างไรก็ตามพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และกระตุ้นร่วมกันด้วยสารทั้ง 2 ชนิด

สรุปผลการทดลอง เซลล์ทั้ง 2 ชนิดมีการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน1-เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสและมีการหลั่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดออกมามากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับการกระตุ้นร่วมกัน

Abstract

HMGB1 was first characterized as a nuclear protein, extracellularly act as a cytokine. HMGB1 has been found in Rheumatoid Arthritis, gingival crevicular fluid and periodontium of periodontitis patients. The gene expression and secretion of HMGB1 also has been exhibited in gingival and periodontal ligament (PDL) fibroblasts by activated with lipopolysaccharide of *Porphyromaonas gingivalis*.

Objectives: To study effect of HMGB1 on tumor necrosis factor alpha (TNF-α) Interleukin -1 beta (IL-1β) and Metrix metalloprotienase-1 (MMP-1) gene expression and protein secretion by activated Human gingival and periodontal ligament fibroblasts with combination of HMGB1 and LPS of *P. gingivalis* compare with HMGB1, *P.gingivalis* LPS and control

Materials and Methods: Human gingival and periodontal fibroblasts were derived from explants obtained from 2 healthy individuals with non-inflamed periodontal supporting tissue. Cells were co-cultured with combination of HMGB1 and *P. gingivalis* LPS, HMGB1 and *P.gingivalis* LPS alone, and no any stimulant as control. After 48 hours, TNF-α, IL-1β and MMP-1 level in supernatants was measured by ELISA. TNF-α, IL-1β and MMP-1 mRNA expression was investigated by Realtime PCR after 4 hours activation. TNF-α, IL-1β and MMP-1 levels were compared by using One-way analysis of variance (One-way ANOVA) and T test and mRNA expressions were analyzed descriptively.

Results: Both cells secreted TNF-α, IL-1β and MMP-1 in combine group more than control, HMGB1 and LPS group and we found TNF-α, IL-1β and MMP-1 level in LPS group more than control and HMGB1 group.($P<0.01$). TNF-α, IL-1β secretion on both cells weren't correlated with mRNA expression. However, clearly mRNA expression of MMP-1 was exhibited in only PDL fibroblasts after HMGB1, LPS and combine activations than control.

Conclusion: The Combination of HMGB1 and LPS of P. gingivalis could activate human gingival and PDL fibroblasts to release more TNFα, IL1β and MMP-1 after 48 hours of stimulation.

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

เอชเอ็มจีบี1 (High mobility group box 1, HMGB1) เป็นโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียส มีขนาดเล็ก น้ำหนักโมเลกุล 25 KDa ลักษณะโครงสร้างของเอชเอ็มจีบี1 แบ่งเป็น 3 ส่วน ประกอบด้วย ส่วนจับของดีเอ็นเอ (DNA binding domain) 2 ส่วน มีรูปร่างคล้ายตัวแอล เรียกว่าเอชเอ็มจีบอกซ์ (HMGBoxes) และส่วนปลายด้านคาร์บอกซี (C-Terminal) ซึ่งมีส่วนปลายที่เป็นกรด (Acidic tail) ประกอบด้วยกรดอะมิโนแอสปาติก (Aspartic acid) และกรดอะมิโนกลูตามิก (Glutamic acid) เรียงตัวซ้ำกันของกรดอะมิโน 35 - 40 หน่วย แต่เดิมเอชเอ็มจีบี1 ถูกค้นพบเป็นส่วนประกอบหนึ่งของนิวเคลียส[1] มีบทบาทต่อการแสดงออกของดีเอ็นเอ เช่น กระบวนการทรานสคริปชั่น (Transcription) วี(ดี)เจ รีคอมบิเนชั่น (V(D)J recombination) สามารถจับกับดีเอ็นเอทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอมีเสถียรภาพ

การศึกษาต่อมาพบว่าเอชเอ็มจีบี1มีบทบาทภายนอกเซลล์ด้วย[2,3] โดยถูกหลั่งออกจากเซลล์ในร่างกายหลายได้ชนิดเมื่อได้รับการกระตุ้นเช่น แมกโครฟาจ (Macrophage) โมโนไซต์ (Monocyte) เซลล์บุผนังหลอดเลือด (Endothelial cell) เซลล์เดนไดรติก (Dendritic cell) และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle cell) นอกจากนี้เซลล์ภายในช่องปาก เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ก็สามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี1ได้เช่นกัน[4,5]

บทบาทของเอชเอ็มจีบี1 เมื่อถูกขับออกนอกเซลล์จะทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบโดยจะหลั่งออกมาได้ช้ากว่าไซโตไคน์ชนิดอื่นเช่น ตรวจพบการหลั่งเอชเอ็มจีบี1ภายหลังกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ 6 - 8 ชั่วโมง[2] และพบปริมาณเอชเอ็มจีบี1 ในเซรั่มหนูมากขึ้นภายหลังกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ 16 ถึง 36 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบการหลั่งทูมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาเมื่อกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1[6]

เอชเอ็มจีบี1 ยังมีบทบาทต่อการเกิดโรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ไม่ว่าจะเป็นการอักเสบแบบเฉียบพลันหรือเรื้อรัง เช่น โรคไขข้ออักเสบ (Arthritis)[7,8] โดยพบเอชเอ็มจีบี1ในบริเวณรอยโรคเช่น พบเอชเอ็มจีบี1 ในบริเวณเยื่อหุ้มข้อต่ออักเสบ (Synovial tissue) และของเหลวภายในข้อต่อ (Synovial fluid) ของผู้ป่วยโรคไขข้ออักเสบ หรือพบเอชเอ็มจีบี1 ในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (Sepsis)

เนื่องจากโรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อที่มีการอักเสบที่สำคัญของโรคในช่องปาก จึงเป็นที่ได้รับความสนใจว่าเอชเอ็มจีบี1 น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับเซลล์ในช่องปากและขบวนการอักเสบของโรคปริทันต์อักเสบด้วย จากการวิจัยของกนิษฐ์และคณะในปี 2006[3] สามารถตรวจพบเอชเอ็มจีบี1 ในไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ (Gingival and Periodontal ligament fibroblasts) ในสภาวะปกติ และพบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1 ในระดับแมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของอีโคไล (E.*coli*) และจากการศึกษาของรุ่งทิวาและคณะในปี2008[4] พบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1ทั้งในระดับแมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีน เมื่อกระตุ้นไฟโบรบลาสต์เหงือกด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส (P *gingivalis* Lipopolysaccharide) ซึ่งจัดว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญของโรคปริทันต์อักเสบอีกด้วย

นอกจากการศึกษาดังกล่าวยังพบว่ามีการศึกษาที่แสดงถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี1กับโรคในช่องปากอยู่บ้าง เช่น พบเอชเอ็มจีบี1 ในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและพบเอชเอ็มจีบี1ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ[9] และพบการหลั่งเอชเอ็มจีบี1เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแอกริเกตริแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเต็มโคมิแทนส์ (Aggregatibactor *Actinomycetemcomitans*)[10] พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส[5]

สืบเนื่องจากประเด็นเอชเอ็มจีบี1เมื่อถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์และทำงานร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรียจะทำหน้าที่เป็นเสมือนไซโตไคน์ ทำให้มีประเด็นที่เป็นเรื่องน่าสนใจว่าเมื่อเอชเอ็มจีบี1ทำงานร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสแล้วจะไปมีผลกระตุ้นเซลล์ในช่องปากให้เกิดผลอื่นๆเกิดขึ้นบ้างหรือไม่ เช่น กระตุ้นการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาได้หรือไม่ หรือแม้แต่ไปกระตุ้นเซลล์ในช่องปากให้หลั่งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสออกมาทำลายเนื้อเยื่อด้วยหรือไม่ คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลการตอบสนองในระดับยีนและโปรตีนของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1เปรียบเทียบกับสภาวะปกติหรือกระตุ้นด้วยสารเพียงตัวใดตัวหนึ่ง โดยโปรตีนทั้ง 3 ชนิดมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ การศึกษาการทำงานร่วมกันของเอชอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสน่าจะช่วยอธิบายกลไกการเกิดโรคปริทันต์อักเสบรวมถึงพัฒนาวิธีการรักษาโรคปริทันต์อักเสบต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

การวิจัยนี้มีความมุ่งหมายเพื่อศึกษาถึงการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา, อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในระดับเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเปรียบเทียบกับกระตุ้นด้วยสารเพียงตัวใดตัวหนึ่งหรือไม่ได้กระตุ้นสารใดๆ

ความสำคัญของการวิจัย

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะปริทันต์ทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง อันเป็นผลมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีการทำลายเหงือกเอ็นยึดปริทันต์และกระดูกเบ้าฟันนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด ปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์คือแบคทีเรียก่อโรคและความสมดุลระหว่างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายกับแบคทีเรียก่อโรค โดยเมื่อมีการรุกรานของแบคทีเรียทำให้เกิดการตอบสนองของร่างกายต่อแบคทีเรีย ในรูปแบบการหลั่งไซโตไคน์และ

สารสื่ออักเสบต่าง ๆรวมถึงเอนไซม์ที่ย่อยสลายองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก ก่อให้เกิดการอักเสบและทำลายอวัยวะปริทันต์ตามมาได้

เอชเอ็มจีบี1จัดเป็นนิวเคลียสโปรตีนซึ่งจะพบอยู่ในนิวเคลียสในสภาวะปกติ มีบทบาทต่อการแสดงออกของดีเอ็นเอ การศึกษาระยะต่อมาพบว่าเอชเอ็มจีบี1ไม่ได้จำกัดหรือมีบทบาทเฉพาะในเซลล์ พบว่าเอชเอ็มจีบี1สามารถทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์เมื่อถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ โดยพบการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาในระดับยีนและโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1[6] ส่วนงานวิจัยภายในช่องปากพบการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อก่อโรคปริทันต์[5,10]นอกจากนี้ยังพบเอชเอ็มจีบี1ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ[9] จากผลการวิจัยดังกล่าวเอชเอ็มจีบี1อาจมีบทบาทเกี่ยวกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมของบทบาทของเอ็มจีบี-1ที่มีผลต่อเซลล์ไฟรโบรบาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยการแสดงออกของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาการแสดงออกของไซโตไคน์ อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า และทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา และเอ็นไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในระดับยีนและโปรตีนในสภาวะปกติและเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และกระตุ้นร่วมกันด้วยสารทั้ง 2 ชนิด

นิยามคำศัพท์เฉพาะ

HMGB 1 : เอชเอ็มจีบี1
Periodontitis : โรคปริทันต์อักเสบ
Human gingival fibroblast : เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมนุษย์
Human periodontal ligament fibroblast : เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์
Interleukin-1β : อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า
Tumor necrosis factor α : ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา
Matrix metalloproteinase–1 : เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1

กรอบแนวคิดในการทำวิจัย

สาเหตุหลักของโรคปริทันต์อักเสบ คือ แบคทีเรียก่อโรคและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียก่อโรคและปัจจัยที่มีความรุนแรงของแบคทีเรียในรูปแบบการหลั่งไซโตไคน์และสารสื่ออักเสบเช่น อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ โพรสตาแกลนดิน (Prostaglandin) จากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น โมโนไซต์ แมกโครฟาจ เป็นต้น นอกจากนี้เซลล์ไฟโบรบ

ลาสต์เองก็ยังเป็นเซลล์ที่สามารถหลั่งไซโตไคน์ในขบวนการของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน

สืบเนื่องจากพบว่าเอชเอ็มจีบี1 มีคุณสมบัติที่ทำหน้าที่ได้หลายชนิด งานวิจัยบางส่วนพบว่าเอชเอ็มจีบี1 สามารถทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งออกมาภายหลังไซโตไคน์ชนิดอื่น[5] และพบว่าเอชเอ็มจีบี1 สามารถทำงานร่วมกับตัวกระตุ้นอื่นๆในการกระตุ้นให้เซลล์มีการหลั่งไซโตไคน์ออกมามากขึ้น การวิจัยก่อนหน้านี้พบเอชเอ็มจีบี1มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิดเช่น โรคไขข้ออักเสบ สภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด ส่วนงานวิจัยเอชเอ็มจีบี1ที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบพบว่ามีบ้างเช่น สามารถตรวจพบเอชเอ็มจีบี1 ในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ[9] และพบการหลั่งเอชเอ็มจีบี1ออกภายนอกเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ เช่น พอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวาลิส แอกริเกตริแบคเตอร์ แอคติโนมัยซิเต็มโคมิแทนส์

จากงานวิจัยที่ผ่านมาข้างต้นทำให้ผู้วิจัยจึงคิดว่าเอชเอ็มจีบี1อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ โดยเอชเอ็มจีบี1อาจทำงานร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสไปกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ให้มีการหลั่งไซโตไคน์และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ในปริมาณที่สูงขึ้น หรือเป็นลักษณะที่เสริมการกระตุ้นของตัวกระตุ้นอื่นก็ยังเป็นได้ ซึ่งผลที่คาดหวังจากการวิจัยนี้น่าจะอธิบายกลไกพยาธิกำเนิดและการดำเนินไปของโรคปริทันต์อักเสบได้ดียิ่งขึ้นเพื่อเป็นข้อพิจารณาสำหรับเลือกแนวทางในการรักษาโรคปริทันต์ต่อไป

สมมติฐานการวิจัย

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์มีการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส มากกว่ากระตุ้นด้วยสารเพียงตัวใดตัวหนึ่งเพียงอย่างเดียว

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1.เอชเอ็มจีบี1

2.การหลั่งเอชเอ็มจีบี1และบทบาทไซโตไคน์ของเอชเอ็มจีบี1

3.ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา

4.อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า

5.เมริกเมทัลโลโปรตีเนส-1

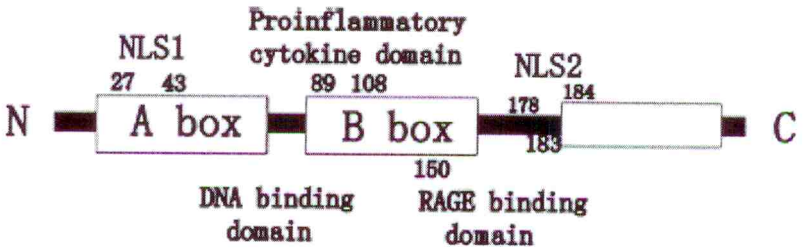
เอชเอ็มจีบี1

โครงสร้างของเอชเอ็มจีบี1

เอชเอ็มจีบี1 (High mobility group box 1; HMGB1) เป็นโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียส ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อประมาณ 39 ปี มีขนาดหน่วยอะมิโน 215 ยูนิต เป็นสมาชิกในกลุ่มเอชเอ็มจีโปรตีน (High-mobility group protein family) ซึ่งประกอบด้วย เอชเอ็มจีบี (HMGB) เอชเอ็มจีเอ็น (HMGN) และ เอชเอ็มจีเอ (HMGA) แต่ละกลุ่มสมาชิกต่างกันที่ส่วนลำดับที่ทำหน้าที่ (Functional sequence motif) ส่วนลำดับที่ทำหน้าที่ของเอชเอ็มจีเอ เรียกว่า เอทีฮุค (AT-hook) ส่วนลำดับหน้าที่ของเอชเอ็มจีเอ็นเรียกว่า ส่วนจับของนิวคลิโอโซม (Nucleosomal binding protein) ส่วนลำดับหน้าที่ของเอชเอ็มจีบี เรียกว่า เอชเอ็มจีบ็อกซ์ (HMG boxes)

โครงสร้างของเอชเอ็มจีบี (HMGBs) ประกอบด้วย 3 ส่วน (Domain) ได้แก่ เอชเอ็มจีบอกซ์ (HMG boxes) ซึ่งเป็นส่วนจับของดีเอ็นเอ (DNA binding domains) มีลักษณะเป็นรูปตัวแอลซึ่งเอชเอ็มจีบีบ็อกซ์ แบ่งเป็น เอชเอ็มจีบอกซ์เอ (HMG box A) และ เอชเอ็มจีบอกซ์บี (HMG box B) แต่ละส่วนของเอชเอ็มจีบอกซ์มีขนาดหน่วยอะมิโนประมาณ 75 ยูนิต และส่วนปลายด้านซี (C-terminal) ที่มีฤทธิ์เป็นกรด (Acidic tail) มีขนาดหน่วยอะมิโนประมาณ 30 ยูนิต

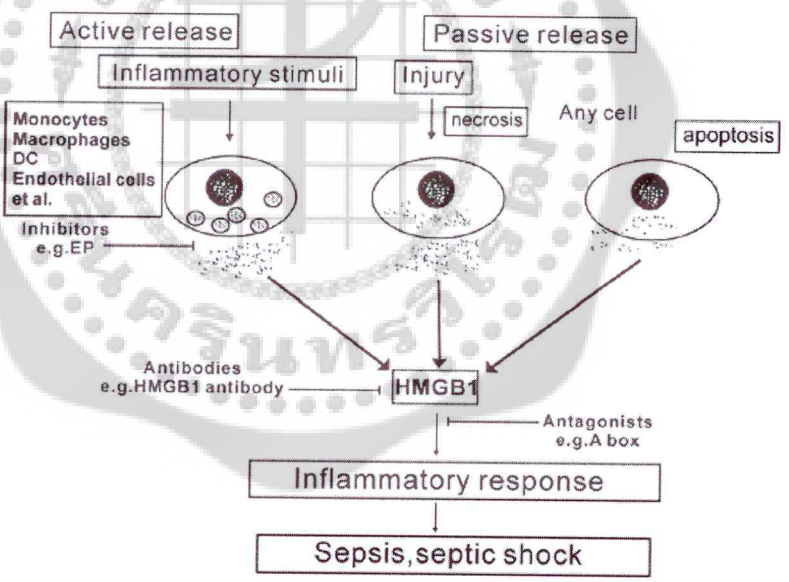
ยีนเอชเอ็มจีบี1ในมนุษย์อยู่บนโครโมโซม 13q12 เอชเอ็มจีบี1 สามารถจับกับดีเอ็นเอ (DNA binding domains) และมีบทบาทต่อการแสดงออกของดีเอ็นเอ ทำหน้าที่คงสภาพนิวคลิโอโซม (Nucleosomes) และควบคุมแสดงออกของยีน (Gene transcription)



รูปที่1 แสดงโครงสร้างของเอชเอ็มจีบี1[11]

การหลั่งและบทบาทไซโตไคน์ของเอชเอ็มจีบี1

เซลล์สามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ได้ 2 วิธี คือ แอกทีฟซิคริชั่นซึ่งเป็นการหลั่งเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นเช่นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ เอชเอ็มจีบี1 ถูกขับออกจากนิวเคลียสด้วยขบวนการอะซิติวเลชั่น (Acetylation) และถูกบรรจุขับออกนอกเซลล์ด้วยกระบวนการเอ็กโซไซโตซิส (exocytosis) ในสภาวะปกติตรวจไม่พบปริมาณเอชเอ็มจีบี1 ในพลาสมา แต่เมื่อมีการอักเสบจะพบปริ



รูปที่ 2 แผนผังแสดงการหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ด้วยวิธีแอกทีฟซิคริชั่นและแพสซีฟซิคริชั่น[11]

มาณเอชเอ็มจีบี1ได้ถึง 83.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร[5] เอชเอ็มจีบี1 ถูกหลั่งในอีกรูปแบบหนึ่งเรียกว่าแพสซีฟซิคริชั่น ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อเกิดการตายของเซลล์แบบเนคโครซิสและอะพอพโตซิส[10] เซลล์ที่สามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ได้แก่ โมโนไซต์ แมกโครฟาจ เด็นไดรติกเซลล์ (Dendritic cell) นิวโทรฟิล (Neutrophil) เซลล์บุผิว (Epithelial cell) เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (Endothelial cell) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle cell)[9,12-14] นอกจากนี้เซลล์ภายในช่องปากที่สามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี1ได้ ได้แก่ ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

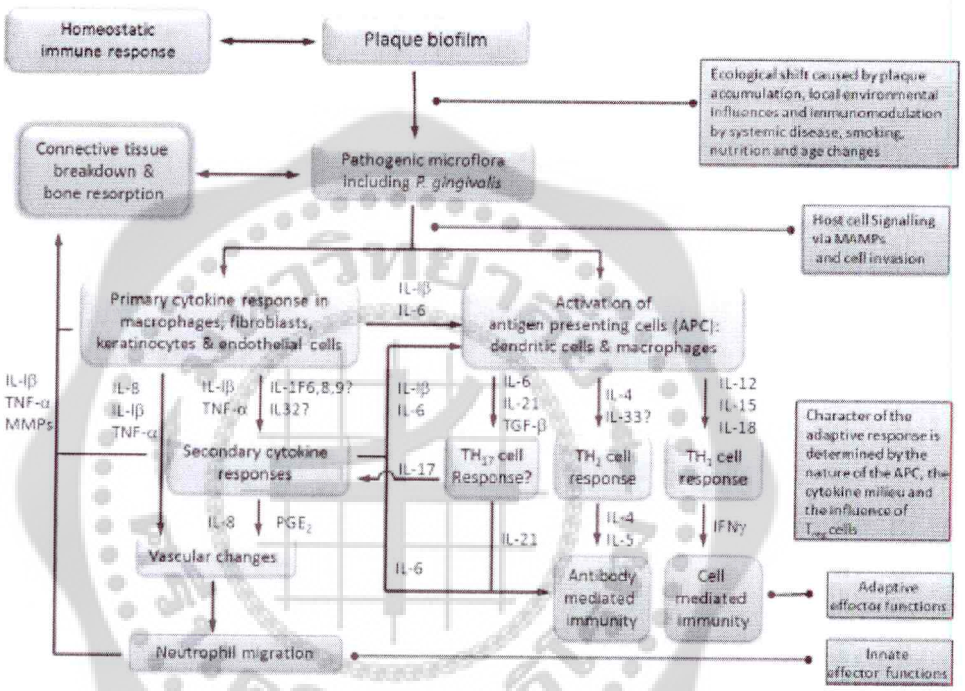
เป็นที่น่าสงสัยในบทบาทของเอชเอ็มจีบี1 ที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ โดยพบการหลั่งไซโตไคน์ภายหลังกระตุ้นเซลล์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 หรือพบการทำงานของเอชเอ็มจีบี1ในลักษณะการเสริมฤทธิ์สารกระตุ้นอื่นให้มีการหลั่งไซโตไคน์ออกมามากขึ้น Andersson และคณะในปี 2000[6]ได้ทำการทดลองกระตุ้นโมโนไซต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1ด้วยความเข้มข้นถึง 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา เมื่อกระตุ้นโมโนไซต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นต้นไปโดยมีการแสดงออกเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอชเอ็มจีบี1 ที่ใช้กระตุ้น นอกจากนี้ยังพบไซโตไคน์ชนิดอื่นอีกได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-1แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า อินเตอร์ลิวคิน-6, อินเตอร์ลิวคิน-8 การศึกษาในสัตว์ทดลองโดย Wang และคณะในปี 1999[2] ได้ค้นพบบทบาทไซโตไคน์ของเอชเอ็มจีบี1 โดยพบปริมาณเอชเอ็มจีบี1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากกระตุ้นโมโนไซต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และจากการทดลองในสัตว์ทดลองได้มีการฉีดแอนติเอชเอ็มจีบี1 (Anti-HMGB1) พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหนูทดลองได้ เอชเอ็มจีบี1 ยังสามารถทำงานเสมือนโปรตีนช่วยจับ(Binding Protein) โดยสามารจับกับไลปิด เอ ของไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียต่างๆ เช่น ซาโมเนลล่า(Salmonella) และ อีโคไล *(E. Coli)*[15] ทำให้เกิดการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่ทำให้เชื่อได้ว่า เอชเอ็มจีบี1 น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคที่มีลักษณะการอักเสบ โดยพบเอชเอ็มจีบี1 มากขึ้นในรอยโรคไขข้ออักเสบ (Arthritis)[7,8] ภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือด (Sepsis)[16] ภาวะความเสียหายของปอด (Acute lung injury)[17] งานวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าเอชเอ็มจีบี1ส่งสัญญาณผ่านตัวรับสัญญาณคือ ตัวรับสัญญาณแอดวานซ์ไกลเคชั่น (Receptor for advanced glycation end product: RAGE) และตัวรับสัญญาณโทล-ไลค์ 2, 4 (Toll-like receptor 2,4)[13,18] และเกิดการส่งสัญญาณผ่านไมโตเจนแอกติเวทเต็ท โปรตีน ไคเนส (mitogen-activated protein (MAP) kinase) พลาสมิโนเจน แอกติเวชั่น (Plasminogen activation) กวาโนซีน ไตรฟอสฟาเทส (Guanosine triphosphatases) Cdc42 และ นิวเคลียแฟกเตอร์ แคปป้า บี (Nuclear factor KB ;NF-kB)[19,20] ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ดังตารางที่ 1

Cells	HMGB1	Effects
macrophages/monocytes	1. Increase TNF mRNA and protein release; increase iL-1α, β, IL-RA, IL-6, IL-8, MIP-1α and β release 2. Release after LPS stimulation	Inflammation
Endothelial cells	Induces expression of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) and RAGE; induces cytokine release (TNF and IL-8) and expression of MCP-1, tPA, and PAI-1	Increase neutrophil adhesion, inflammation, regulation of fibrinolysis
Neutrophils	Increase TNF,IL-1β and IL-8 gene expression	Inflammation
Epithelial cells	Increase enterocyte permeability	Increase bacterial translocation
Dendritic cells	1. Increase TNF, IL-1α, IL-6, IL-8, and IL-12 release 2. Increase CD-40, CD54, CD58, CD80 and CD83 expression	Dendritic cell maturation
Smooth muscle cells	Cause cell migration and cytoskeleton reorganization	Chemotaxis
Tissue	**Effects**	
Brain	Induces fever, anorexia, taste aversion, and weight loss; induces brain cytokine expression (TNF, IL-1 and IL-6)	
Lung	Cause acute lung injury, increased pulmonary levels of TNF, IL-1β and MIP-2, lung edema and neutrophil accumulation	
Intestine	Cause intestinal barrier of dysfunction and bacterial translocation	
Joints	Induces arthritis and inflammation	
Heart	Arrhythmia	
Others	Bactericidal activity	

ตารางที่1 บทบาทของเอชเอ็มจีบี1ต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ[16]

เป็นที่ทราบดีว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเป็นปัจจัยความรุนแรงของแบคทีเรียที่กระตุ้นให้เกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ได้ โดยเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ส่วนนอกของแบคทีเรีย ประกอบด้วยไลปิด เอ (Lipid A) คอร์ โพลีแซคคาไรด์ (Core Polysaccharide) และโอ

แอนติเจน (O Antigen) ในทางทันตแพทยศาสตร์พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสสามารถกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์หลายชนิด รวมถึงไซโตไคน์ที่ผู้วิจัยต้องการศึกษาคือ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งออกมานี้จะไปกระตุ้นเซลล์ต่างๆให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ออกมาเพิ่มขึ้น และทำให้เซลล์เกิดการตอบสนองโดยมีการหลั่งเอนไซม์ต่างๆออกมา เช่น ไลโซไซม์ คอลลาจิเนส ทำให้เกิดการอักเสบและนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบได้ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แผนผังแสดงการตอบสนองของร่างกายต่อเชื้อแบคทีเรียโดยมีการหลั่งไซโตไคน์ ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ ทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกระดูก[21]

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor alpha; TNFα) มียีนอยู่บนโครโมโซมมนุษย์ที่ 6p21.3 มีขนาดโมเลกุลกรดอะมิโน 233 ยูนิต ในปี 1969 Granger และคณะ[22] ได้ค้นพบลิมโพท็อกซิน (lymphotoxin) ซึ่งถูกหลั่งจากลิมโพไซด์ (Lymphocyte) ทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์ ปี 1975 Carswell และคณะ[23] พบไซโตไคน์อีกชนิดหนึ่งซึ่งถูกหลั่งโดยแมคโครฟาจสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบเนคโครซิสเรียกว่า ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ พบว่าทั้งลิมโพท็อกซินและทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ มีโครงสร้างและหน้าที่คล้ายกันจึงมีการเปลี่ยนชื่อทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์และลิมโพทอกซินเป็น ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา และทูเมอร์เนคโคร ซิสแฟกเตอร์ เบต้า (Tumor necrosis factor-β;TNF-β) การศึกษาต่อมาได้มีการค้นพบไซโตไคน์อีกมากที่มีความคล้ายคลึง

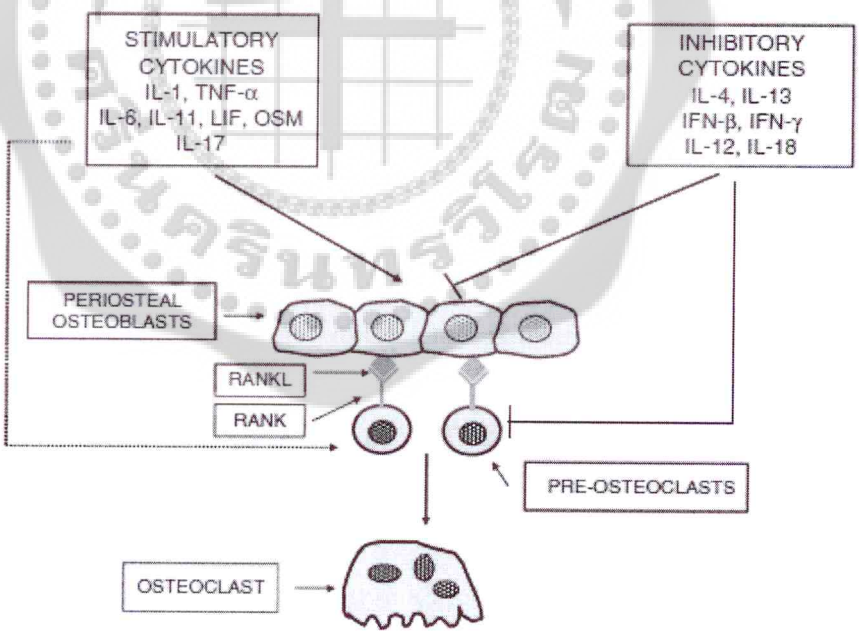
กับทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ จึงมีการจัดหมวดหมู่ขึ้นเรียกว่า ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ ซูปเปอร์แฟมิลี่ (Tumor necrosis factor superfamily) โดยในปี 2008 ได้มีการประชุมนานาชาติเกี่ยวกับทีเอ็นเอฟ (International TNF Conference)[24] โดยทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์อยู่ในซูปเปอร์แฟมิลี่ที่ 2 มีบทบาทและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเซลล์มากมายทั้งในด้านการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์หรือเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยหนูทดลองที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรมเอายีนทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ออก จะได้รับการติดเชื้อจากโปรโตซัวชนิด Leishmania ได้ง่าย[25] นอกจากนี้ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟายังมีบทบาทต่อการควบคุมการนอนหลับ[26] พัฒนาการของตัวอ่อน[27] ควบคุมการแปรสภาพของเซลล์ (Differentiation) มีส่วนในการสร้างอวัยวะ (Organogenesis) และการเจริญใหม่ (Organogenesis and regeneration) มีการส่งสัญญาณร่วมในกระบวนการโฮมิโอสะแตซิส (Homeostasis) และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Immune response) เกี่ยวข้องกับกลไกการอักเสบและอะพอพโตซิส (Mechanisms of inflammation and apoptosis)

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟามีบทบาทต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ โดยพบปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์เพิ่มขึ้นในรอยโรคปริทันต์อักเสบ[28] และตรวจพบทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาความเข้มข้นสูงในน้ำเหลืองเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ[29] Roberts และคณะในปี 1997[30] พบปริมาณของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์เอ็มอาร์เอ็นเอ (Tumor necrosis factor alpha mRNA) ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบมากกว่ากลุ่มที่ปราศจากโรคปริทันต์อักเสบอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟากระตุ้นให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ ลิมโฟไซค์ แมกโครฟาจ หลั่งไซโตไคน์ชนิดอื่นออกมาอีกเช่น อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-11 อินเตอร์ลิวคิน-8 พลอสตาแกลนดิน นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอดฮีชั่นโมเลกุล (Adhesion molecules) เช่น ICAM-1[31] มากขึ้นและกระตุ้นให้เพิ่มการสร้างเอนไซม์ในการย่อยเหงือก เช่น เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสชนิดต่างๆได้แก่ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1[32] คอลลาจิเนส2 (Collagenase 2)[33] และคอลลาจิเนส3 (Collagenase 3) (MMP-13)[34,35] นอกจากนี้ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟายังมีส่วนในการควบคุมต่อการละลายของกระดูกโดยกระตุ้นให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ออสทิโอคลาส (Osteoclast) ได้แก่ เอ็ม-ซีเอสเอฟ (M-CSF) และ รีเซบเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟ นิวเคลียร์ แฟกเตอร์ แคปป้า บี (Receptor activator of nuclear factor kappa-B)[36,37] ทำให้ออสทิโอคลาสพรีเคอเซอร์เซลล์ (Osteoclast precursor) เจริญเป็นเซลล์สลายกระดูก (Adult osteoclast)

อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า

อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า (Interleukin-1β;IL-1β) เป็นไซโตไคน์อยู่ในกลุ่มอินเตอร์ลิวคิน-1แฟมิลี(Interleukin family) ซึ่งประกอบด้วย อินเตอร์ลิวคิน-1แอลฟา (Interleukin-1α;IL-1α) อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า (Interleukin-1β;IL-1β) อินเตอร์ลิวคิน-1รีเซปเตอร์แอนทาโกนิส (Interleukin-1 receptor antagonist; IL-1ra) ยีนอินเตอร์ลิวคิน-1เบต้าในมนุษย์อยู่บนโครโมโซม 2q14 เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทหลากหลาย ทำหน้าที่ร่วมกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าถูกหลั่งออกมาในรูปโปรโปรตีน (Proprotein) และจะถูกเปลี่ยนเป็นรูปแบบที่สามารถทำงานได้ด้วยเอ็นไซม์แคสเปส-1

(Caspase 1; CASP1/ICE) เมื่อเซลล์ได้รับสิ่งแปลกปลอมได้แก่ไลโปโพลีแซคาไรค์ จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณผ่านทางตัวรับสัญญาณโทล-ไลค์ 4 (TLR 4)[38] ทำให้เซลล์เกิดการตอบสนองโดยเพิ่มการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1[39] ทำให้เพิ่มการสร้างแอดฮีชั่นโมเลกุล ได้แก่ เอ็นโดธีเลียล ลิวโคไซค์ แอดฮีชั่นโมเลกุล (Endothelial leukocyte adhesion molecule) อินเตอร์เซลลูลาร์ แอดฮีชั่นโมเลกุล(Intercellular adhesion molecule) และวาสคูล่าแอดฮีชั่นโมเลกุล (Vascular adhesion molecule)[40] ทำให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องต่อการอักเสบสามารถเข้าสู่บริเวณที่มีพยาธิสภาพได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องเกิดการตอบสนองทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อและการทำลายกระดูกเบ้าฟันโดยเพิ่มการหลั่งโพรสตาแกลนดินอี2[41] (Prostaglandin E2;PGE2) และเมื่อใช้หน่วยรับสัญญาณชนิดไม่ติดกับเซลล์ (Soluble receptor) พบว่าสามารถลดการทำลายกระดูกเบ้าฟันได้ 60% ลดการสร้างออสซิโอคลาสได้67%[39] นอกจากนี้พบว่ารอยโรคปริทันต์จะพบปริมาณอินเตอร์ลิวคิน 1 เบต้าเพิ่มขึ้น[42] อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าสามารถกระตุ้นให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มีการแสดงออกของเอนไซม์คอลลาจิเนส[43-45] และลดการผลิตคอลลาเจน[46] นอกจากนี้อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้าและทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟายังมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการละลายของกระดูกโดยมีผลต่อการแสดงออกของรีเซบเตอร์แอกติเวเตอร์ออฟ นิวเคลียร์ แฟกเตอร์ แคปป้า บี ซึ่งอยู่บนผิวของเซลล์ออสทิโอบลาสต์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพรีออสทิโอคลาสเป็นออสทิโอคลาสดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงบทบาทของไซโตไคน์ต่อการเปลี่ยนแปลงของพรีออสทิโอคลาสไปสู่เซลล์สลายกระดูก[47]

เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 (Matrix metalloproteinase-I)

เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1เป็นเอนไซม์ในร่างกายชนิดคอลลาจิเนส (Collagenases) ยีนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ในมนุษย์อยู่บนโครโมโซม 11q22.3 เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1มีบทบาทต่อการเคลื่อนย้ายของเซลล์สภาวะปกติและเมื่อมีพยาธิสภาพ[45] จะมีการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสมากขึ้น เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทได้แก่คอลลาเจนชนิดที่ 1, 3 ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของโปรตีนเมทริกนอกเซลล์ (Extracellular Matrix: ECM)

โครงสร้างของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสประกอบด้วย 2 ส่วนหลักๆ ประกอบด้วยส่วนโปรโดเมน(Pro-domain) เป็นส่วนควบคุมการทำงานของเอนไซม์โดยมกรดอะมิโนซีสเตอีนจับกับสังกะสีทำให้เอนไซม์ไม่ทำงานเรียกตำแหน่งนี้ว่าซิสเตอีนสวิทซ์ (Cysteine switch) โครงสร้างอีกส่วนของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสคือแคตตาไลติก โดเมน (Catalytic Domain) ซึ่งเป็นส่วนที่เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทำให้เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสับเสตรทต่างกัน ได้มีการแบ่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสเป็น 4 กลุ่มย่อยได้แก่ คอลลาจิเนส (Collagenases: MMPs-1, 8, 13) เจลลาติเนส (Gelatinase: MMPs-2, 9) สโตรมีไลซิน (Stromelysin: MMPs-3, 10, 11, 19) และเมมเบรนบาวนไทป์(Membrane bound-types MMP: MMPs-14, 15, 16, 17, 24, 25)[45]

เซลล์ที่สามารถหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ได้แก่ ไฟโบรบลาสต์ เคราติโนไซต์ เซลล์เยื่อบุผิว ออสทิโอบลาสต์ คอนโดไซต์ โมโนไซต์หรือแมกโครฟาจ[48,49] ซึ่งจะถูกหลั่งออกมาในรูปแบบที่ยังไม่สามารถทำงานได้เรียกว่าไซโมเจน (Zymogen) และจะทำงานเมื่อได้รับการกระตุ้น ทำให้มีการตัดพันธะระหว่างกรดอะมิโนซีสเตอีนกับสังกะสี ทำให้เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสสามารถทำงานได้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าไซโตไคน์ ฮอร์โมน และชีวเคมีสารในร่างกายที่สามารถกระตุ้นหรือยับยั้งการสร้างเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสดังที่ได้สรุปในตารางที่ 2

Induction		Depression
growth factor	other	
IL-1α,β	TGA	Glucocorticoids
TNFα	Okadaic acid	Progesterone
TGFα	Bacterial LPS	TGFβ
EGF	PGE_2	Retinoids
PDGF	Con A	cAMP
bFGF	cAMP	IFN-γ
NGF	PTH	
TGFβ		

ตารางที่ 2 แสดงสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นและยับยั้งการสร้างเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส[50]

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

ในการวิจัยครั้งนี้ ได้เตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์จากฟันผู้ป่วย 2 รายที่ได้รับการถอนฟันจากการผ่าฟันคุดหรือจัดฟัน โดยฟันซี่นั้นและเนื้อเยื่อโดยรอบไม่พบพยาธิสภาพใดๆ นำฟันมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ (Phosphate Buffer Saline; PBS) หลายๆครั้งจนปราศจากเลือดและสิ่งเจือปน ใช้มีดผ่าตัดเบอร์ 11 ตัดชิ้นเหงือกที่ติดกับฟันออกเป็นชิ้นเล็กๆเพื่อให้ได้เนื้อเยื่อเหงือก และใช้มีดผ่าตัดเบอร์ 11 ขูดเนื้อเยื่อที่ติดอยู่บริเวณผิวรากฟันส่วนกลางเพื่อให้ได้เนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ แยกเนื้อเยื่อเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ (Dulbecco Modified Eagle's Medium:DMEM) ที่เติม10% Fetal calf serum, 2 mM L-Glutamine,100 units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomysin) เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 รอจนเซลล์เจริญออกจากชิ้นเนื้อมาอยู่บนจานเลี้ยง ทำการขยายจำนวนเซลล์โดยการถ่าย (Subculture) เซลล์ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) โดยใช้เอ็นไซม์ Trypsin-EDTA เซลล์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-8

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

การเตรียมสารที่ใช้กระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์และไพรเมอร์เพื่อใช้ในขั้นตอนโพลีเมอเรสเชนรีแอ็กชั่น

การเตรียมเอชเอ็มจีบี1

เตรียมรีคอมบิแนนท์เอชเอ็มจีบี1จากบริษัท SIGMA-ALDRISH®, St. Louis, MO, USA นำมาเตรียมความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรละลายในน้ำปราศจากเชื้อ (Sterile dH_2O) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

การเตรียมไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาวิส

เตรียมไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาวิสจากบริษัท Invivogen California, USA นำมาเตรียมความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายในน้ำปราศจากเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

การเตรียมไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส -1 และแกปดีเอช(glyceroldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

ทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับยีนทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา, อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า, เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 และแกปดีเอช จากบริษัท SIGMA-ALDRISH® มีลำดับเบสดังนี้

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา[51]

Forward 5' GAG CAC TGA AAG CAT GAT 3'

Reverse 5' ATC AGG AAG GAG AAG AGG 3' ขนาด 208 bp

แกปดีเอช[52]

Forward 5' ATC CCA TCA CCA TCT TCC AG 3'

Reverse 5' CCA TCA CGC CAC AGT TTC C 3' ขนาด 383 bp

อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า[53]

Forward 5' ACA GAT GAA GTG CTC CTT CCA 3'

Reverse 5' GTC GGA GAT TCG TAG CTG GAT 3' ขนาด 73 bp

เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1[54]

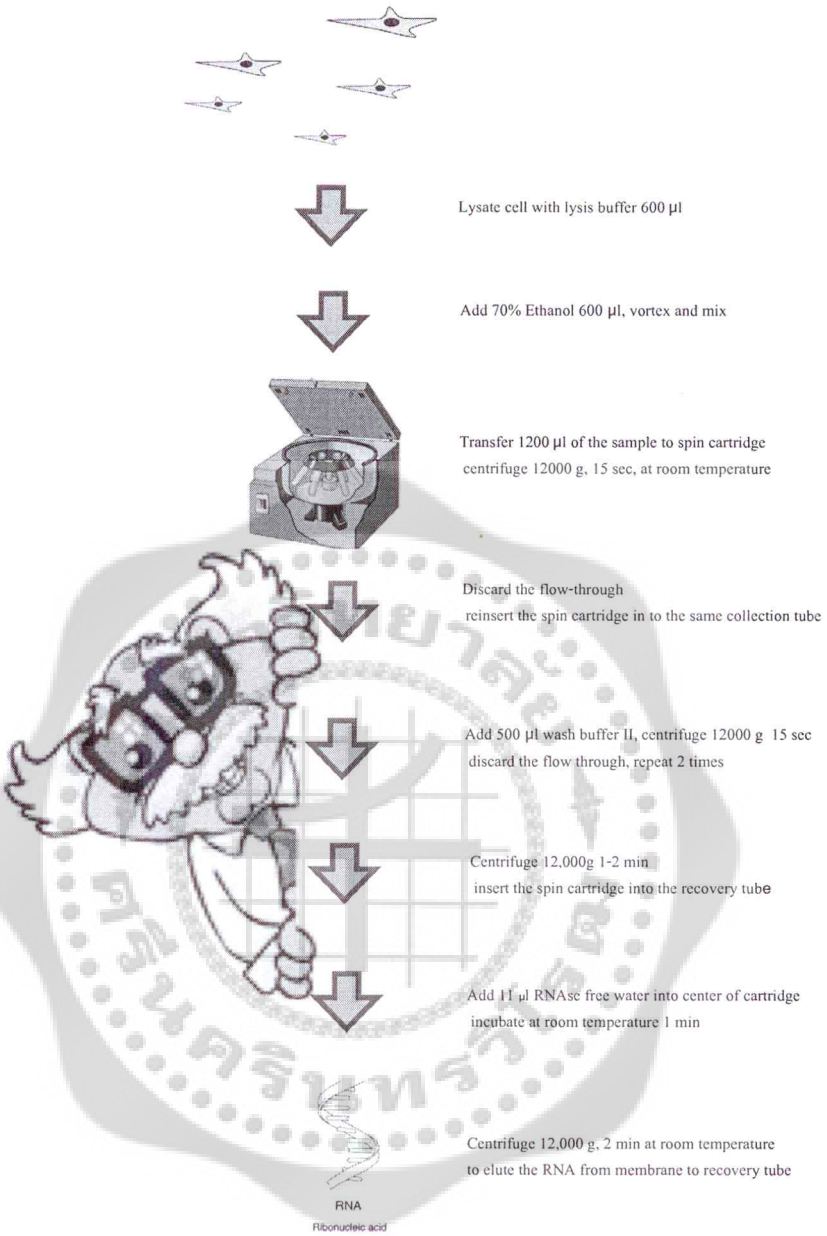
Forward 5' CAC AGC TTT CCT CCA CTG CTG CTG C 3'

Reverse 5' GGC ATG GTC CAC ATC TGC TCT TGG C 3' ขนาด 396 bp

การจัดกระทำและรวบรวมข้อมูล

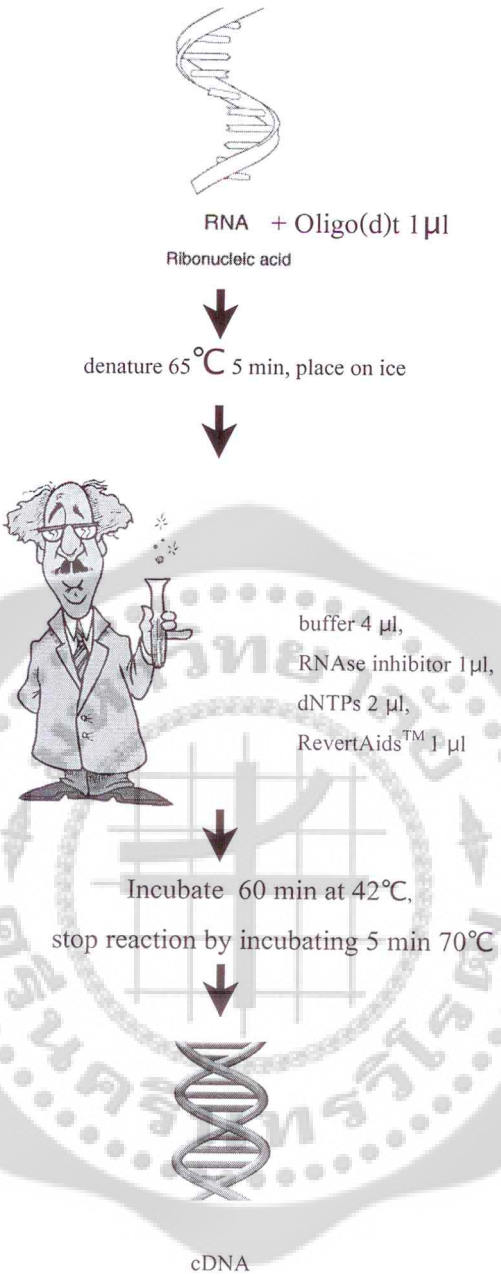
การกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส

การวิจัยนี้ทำการทดลองนำร่องเพื่อหาความเข้มข้นเมื่อทราบความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสและเอชเอ็มจีบี1 ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้น (รายละเอียดในภาคผนวก) ทำการถ่ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ที่เลี้ยงลงในจานเลี้ยงแบบ 6 หลุม ให้มีความหนาแน่น 200,000 เซลล์/หลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซรั่มของวัวร้อยละ 10 ปล่อยให้เซลล์มายึดที่จานเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่มีซีรัมจากฟีตัสของวัว 1 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทำการกระตุ้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดด้วย 4 สภาวะคือ 1).น้ำปราศจากเชื้อ 2). ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 3).เอชเอ็มจีบี1 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 4).เอชเอ็มจีบี1ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการสกัดเมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอภายหลังกระตุ้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดแล้ว 4 ชั่วโมงด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Purelink mini RNA kit) โดยมีขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนการสกัดเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (RevertAid TM first strand cDNA synthesis kit: Fermentas, Life sciences, california, USA) โดยมีขั้นตอนโดยย่อดังแสดงในรูปที่ 6



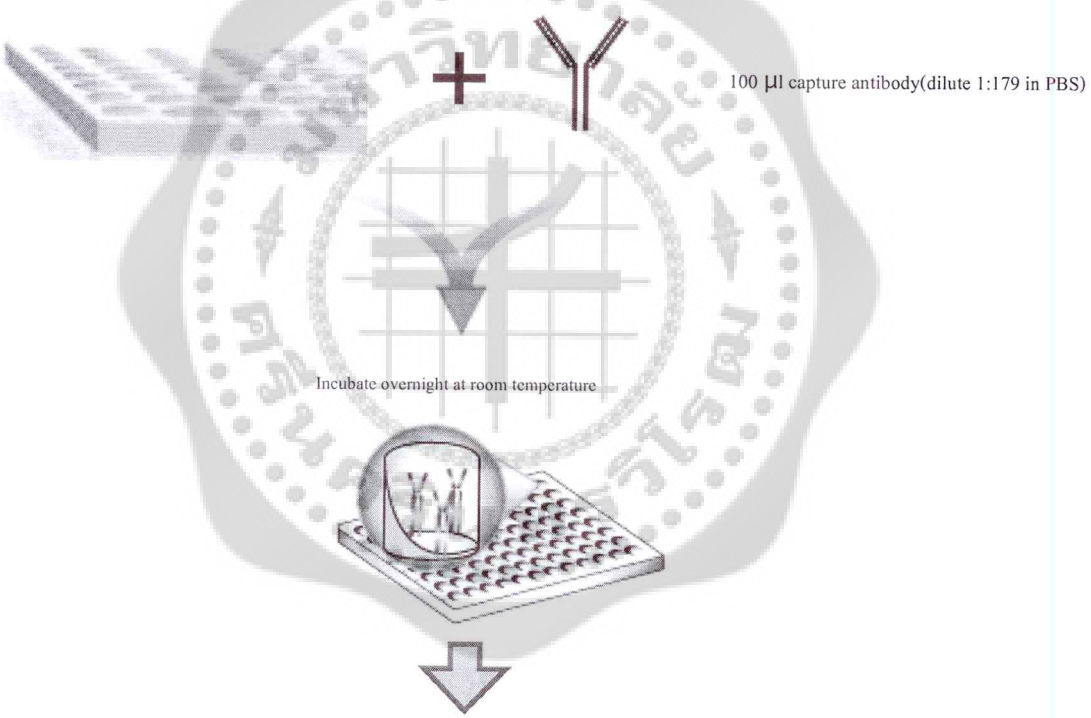
รูปที่ 6 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบจากเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

วิเคราะห์การแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอทั้ง 3 ด้วยเทคนิคเรียลไทม์ รีเวอร์สทรานส์คริพเทส โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น แต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบทำซ้ำ 3 ครั้ง การวิเคราะห์การแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค เรียลไทม์ รีเวอร์สทรานส์คริพเทส โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น มีองค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ไมโครลิตร, สารละลายสำเร็จรูป (LightCycler 480 system;Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ สายละ 0.5 ไมโครลิตร น้ำปราศจากเชื้อ 7 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเมื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหมุนเวียนอยู่ ณ อุณหภูมิ 3 ระดับ โดยใช้อุณหภูมิ Denaturation 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10

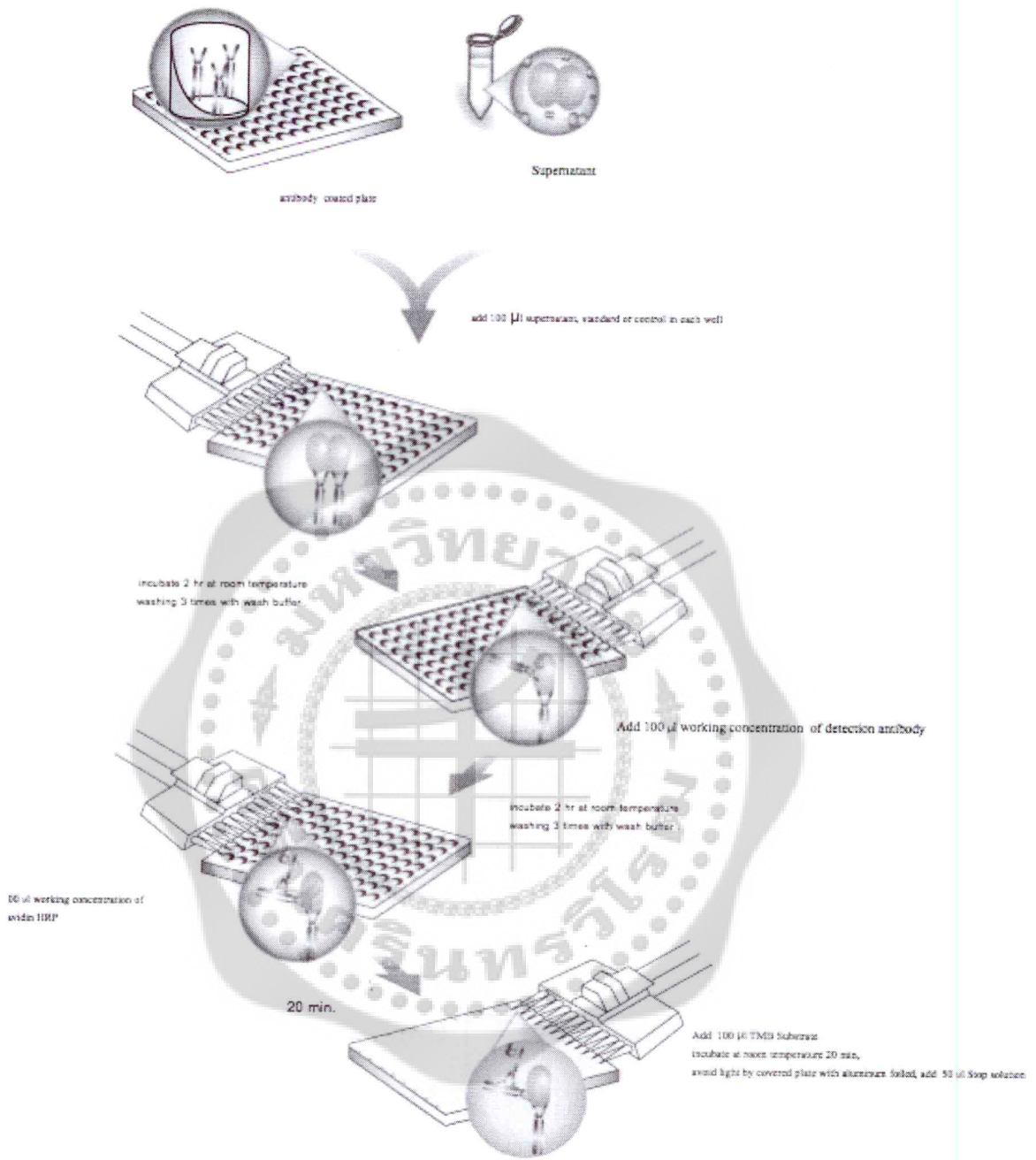
วินาที อุณหภูมิ Annealing 58 องศาเซลเซียส 15 วินาที อุณหภูมิ Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (Light Cycler®480)

การตรวจหาปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ด้วยวิธีอีไลซ่า(ELISA) โดยใช้ชุดทดสอบอีไลซ่าสำเร็จรูป

วิเคราะห์การหลั่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ หลังกระตุ้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดแล้ว 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิคอีไลซ่า ผู้ป่วย แต่ละรายทำซ้ำ 2 ครั้งและแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยชุดทดสอบอีไลซ่าสำเร็จรูป (ELISA DuoSet, R&D systems, Minneapolis, USA) โดยจะต้องทำการเตรียมพื้นผิวหลุมทดลองด้วยการเคลือบแอนติบอดี้ตามขั้นตอนดังรูปที่ 7 และวัดปริมาณสารที่ต้องการทดสอบขั้นตอนการทดลองดังรูปที่ 8



รูปที่ 7 แสดงการเตรียมพื้นผิวหลุมทดลองด้วยการเคลือบแอนติบอด



รูปที่ 8 แผนผังแสดงขั้นตอนการทดลองหาปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน1บต้า เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ด้วยเทคนิคอีไลซ่า

การตรวจหาปริมาณเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ทำการเจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นเซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 30 : 70 ส่วนการตรวจปริมาณอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ทำการเจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นเซลล์ในอัตราส่วน 50 : 50 ส่วนการตรวจหาปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาไม่ทำการเจือจาง นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาแปรผลเป็นความเข้มข้นด้วยการ

เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงจากหลุมทดสอบมาตราฐานโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (Microsoft Excel for Mac 2011)

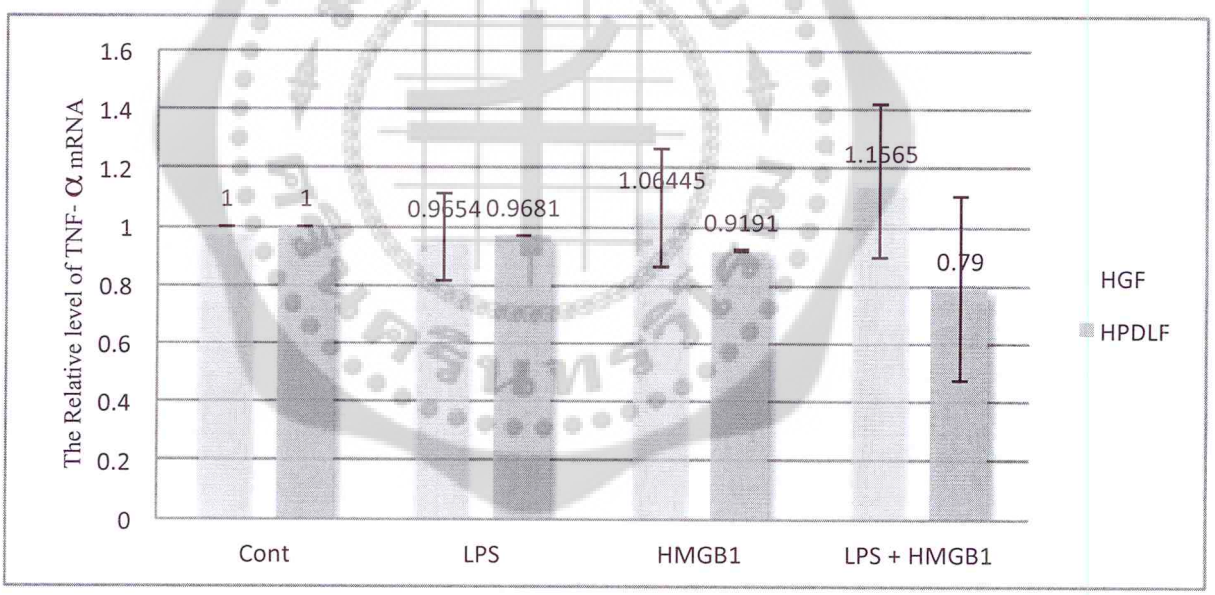
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบผลการแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา, อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าและเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ด้วยสถิติพรรณา เปรียบเทียบความแตกต่างของการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา, อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าและเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ระหว่างกลุ่มและภายในกลุ่มด้วยสถิตการวิเคราะห์การแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และสถิติ Bonferroni ที่นัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปเอสพีเอสเอส 20.0 (SPSS 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

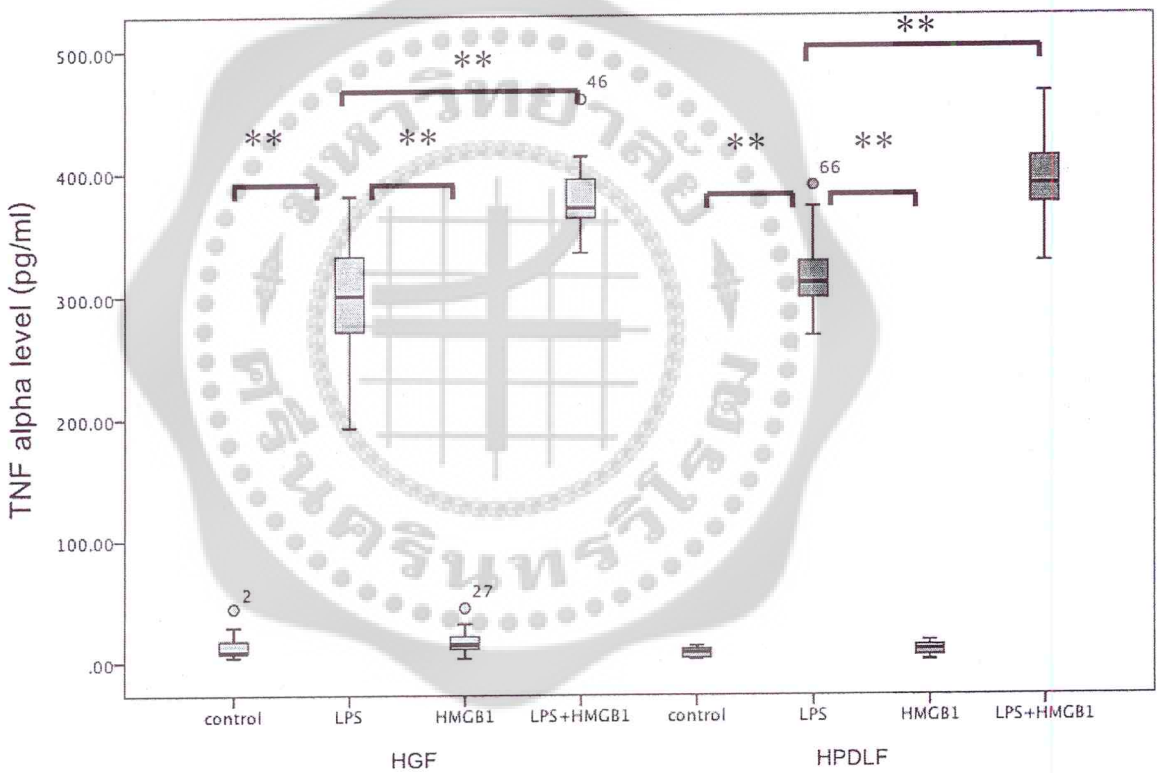
ผลของเอชเอ็มจีบี1 และ/หรือไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอและการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา

จากการตรวจสอบการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ด้วยเทคนิค เรียลไทม์ รีเวอร์สทรานส์คริพเทส โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น พบว่าเซลล์ทั้ง 2 ชนิดเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสและกระตุ้นร่วมกัน พบว่าไม่ปรากฏความแตกต่างอย่างชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟเตอร์ แอลฟาของเอ็นยึดปริทันต์และเหงือกเมื่อได้รับกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 หรือกระตุ้นด้วยสารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่กระตุ้นเลย

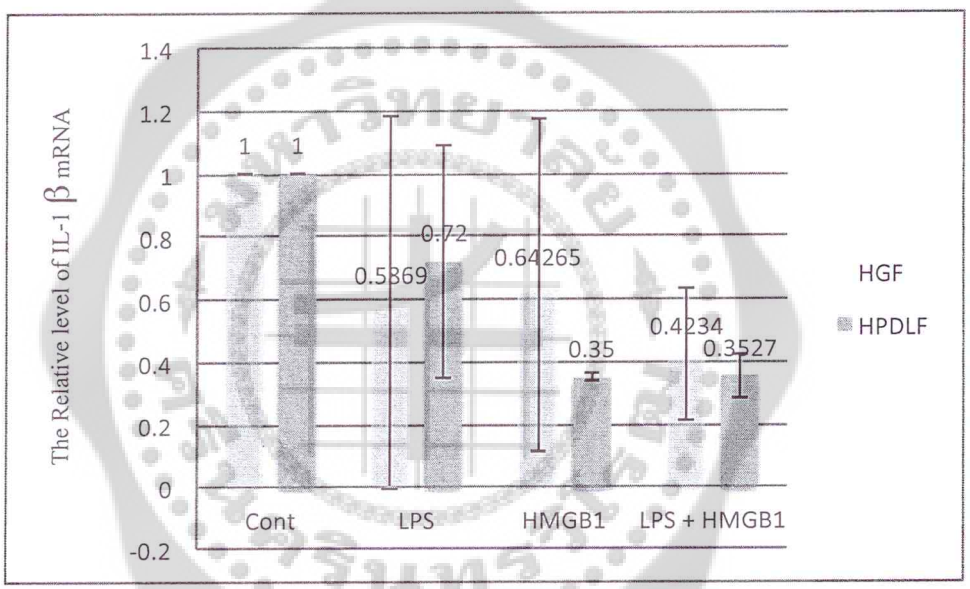
เมื่อตรวจสอบการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ออกมามากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียว หรือเมื่อกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส แตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และพบการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดมากกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ดังแสดงในรูปที่ 10 และตารางที่ 3



รูปที่ 10 แผนภูมิแสดงการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในกลุ่มควบคุมลบ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 และกระตุ้นร่วมกันทั้ง 2 ชนิด

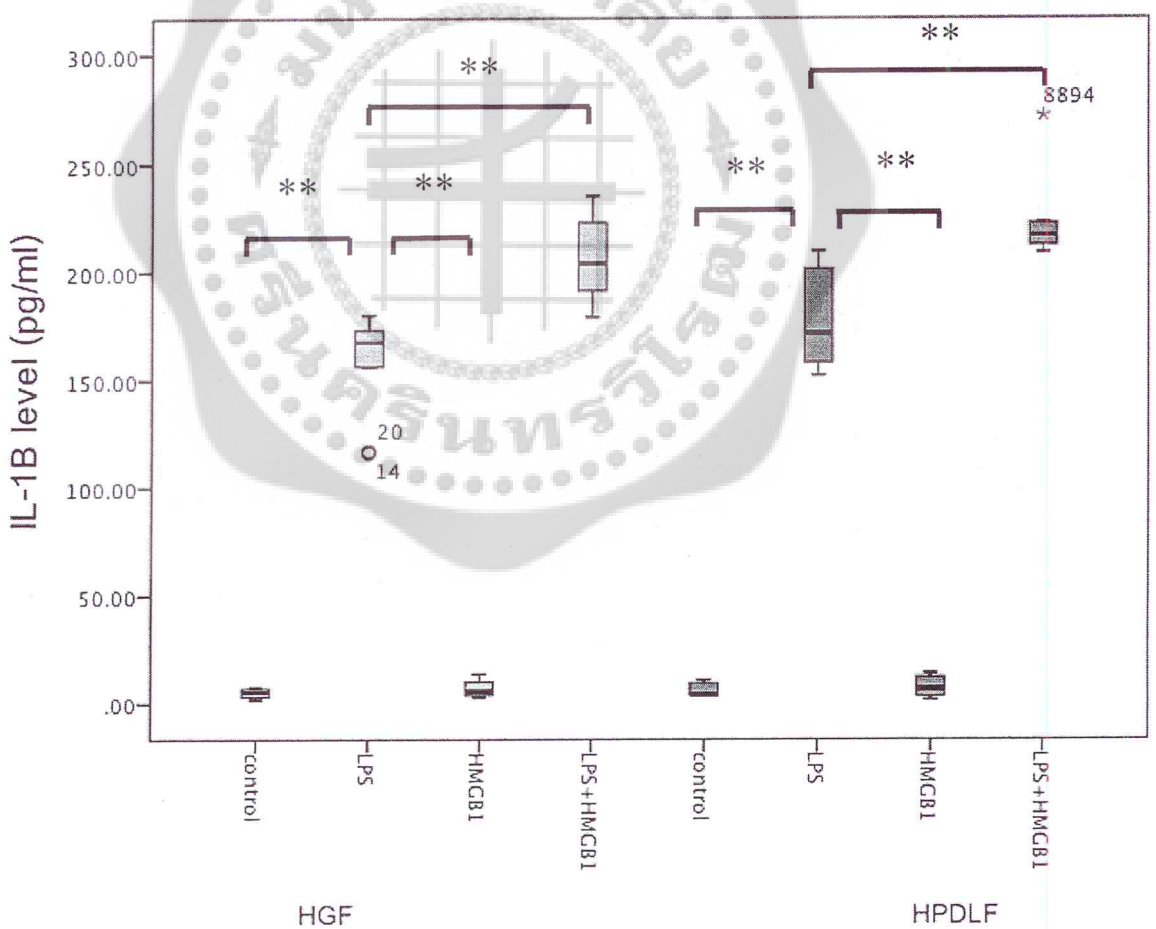
ผลของเอชเอ็มจีบี1 และ/หรือไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอและการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า

เซลล์ทั้ง 2 ชนิดเมื่อได้รับการกระตุ้น มีการตอบสนองโดยมีการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเออินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าของเอ็นยึดปริทันต์และเหงือกเมื่อได้รับกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 หรือกระตุ้นด้วยสารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่กระตุ้นเลย

เมื่อตรวจสอบการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ออกมามากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียว หรือเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส แตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และพบการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดมากกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ดังแสดงในรูปที่ 12 และตารางที่ 3

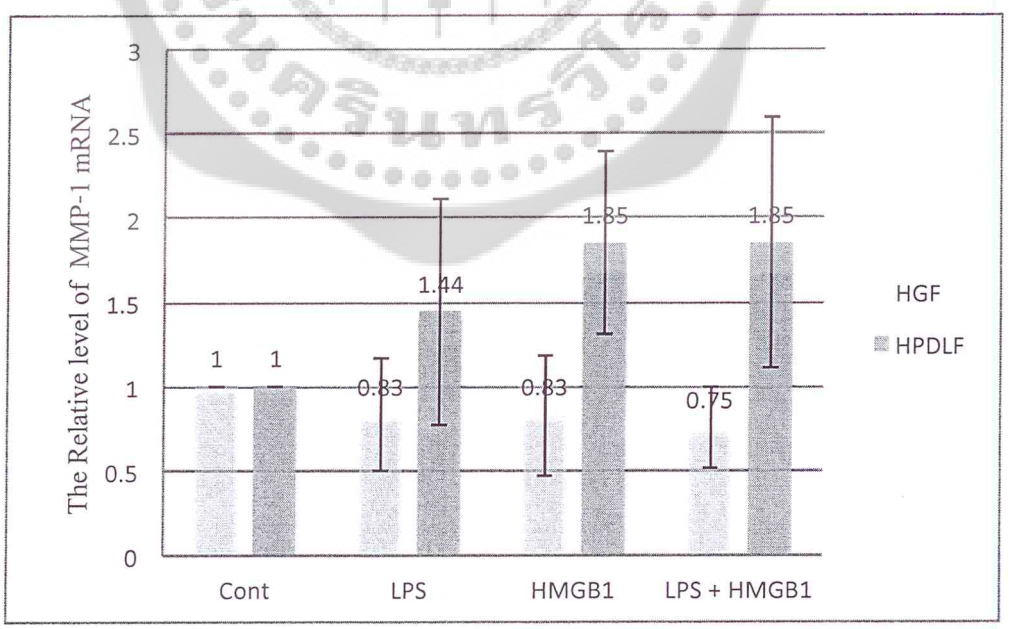


รูปที่ 12 แผนภูมิแสดงการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

ในกลุ่มควบคุมลบ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 และกระตุ้นร่วมกัน

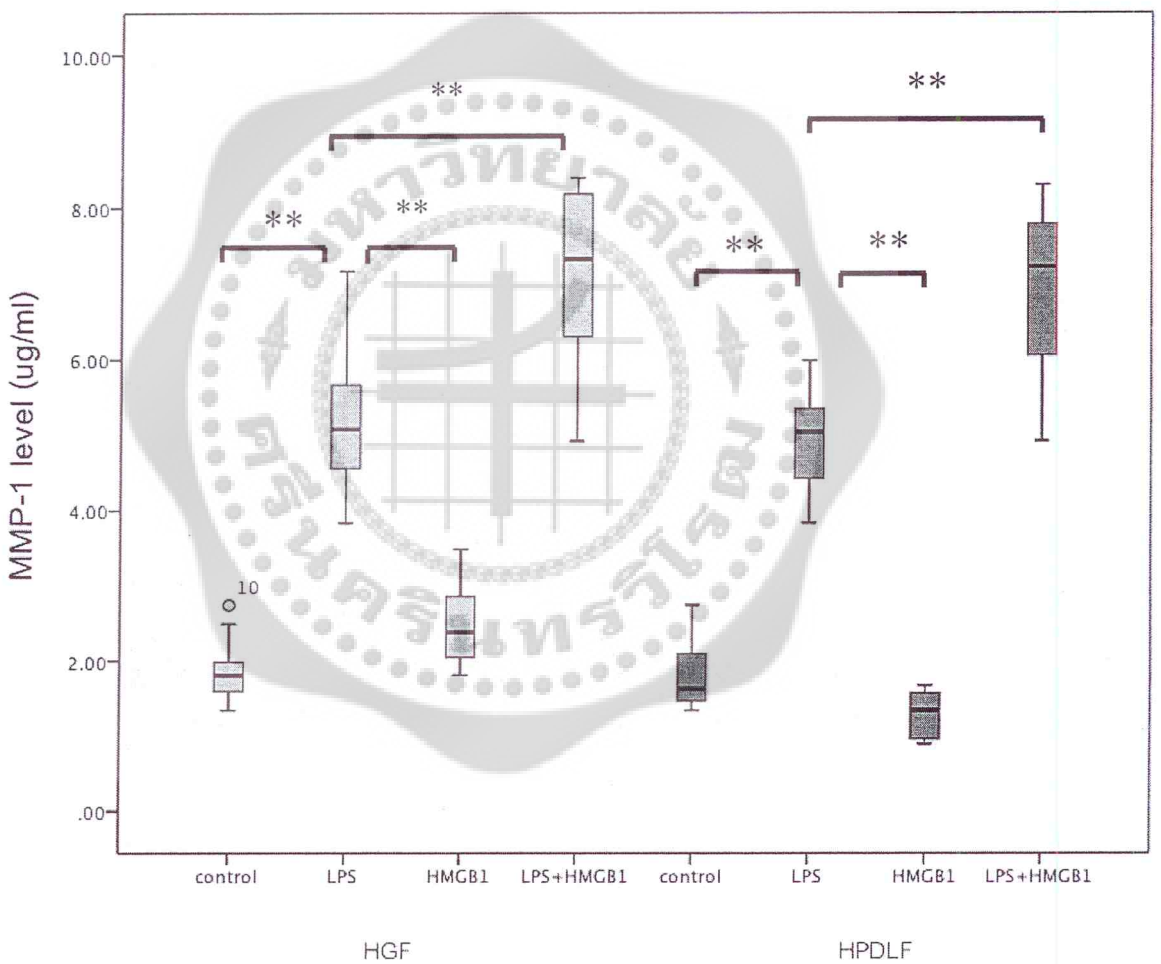
ผลของเอชเอ็มจีบี1 และ/หรือไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอและการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มีการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนสจินจิวาลิส เป็น 1.44 เท่า เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 จะมีการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ เป็น 1.85 เท่า และเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน จะมีการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอ 1.85 เท่าส่วนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกพบว่ามีการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอไม่ปรากฏความแตกต่างที่ชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงสัดส่วนการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ของเอ็นยึดปริทันต์และเหงือกเมื่อได้รับกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 หรือกระตุ้นด้วยสารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่กระตุ้นเลย

จากการตรวจสอบการหลั่งเมทริกเมทัลโลโปรตีเนส-1พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ออกมามากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส แตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และพบการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดมากกว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ดังแสดงในรูปที่ 14 และตารางที่ 3



รูปที่ 14 แผนภูมิแสดงการหลั่งเมทริกซ์ เมทัลโลโปรตีเนส-1 เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกในกลุ่มควบคุมลบ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 และกระตุ้นร่วมกัน

	Gingival Fibroblast	Periodontal ligament Fibroblast
TNF-α level (pg/ml)		
Control	13.87 ± 3.55	7.42 ± 1.14
LPS	297.89 ±16.29	318.02 ± 9.7
HMGB1	17.53 ± 3.26	9.34 ± 1.56
LPS + HMGB1	380.36 ± 9.29	390.37 ± 10.77
IL1-β level (pg/ml)		
Control	5.18 ± 0.63	6.09 + 0.92
LPS	160.16 ± 6.23	177.47 + 6.53
HMGB1	6.99 ± 1.09	7.53 + 1.36
LPS + HMGB1	206.90 ± 5.38	225.20 + 6.47
MMP1 level (ng/ml)		
Control	1.88 ± 0.12	1.80 + 0.14
LPS	5.18 ± 0.26	4.94 + 0.18
HMGB1	2.47 ± 0.15	1.29 + 0.90
LPS + HMGB1	7.12 + 0.33	6.92 + 0.32

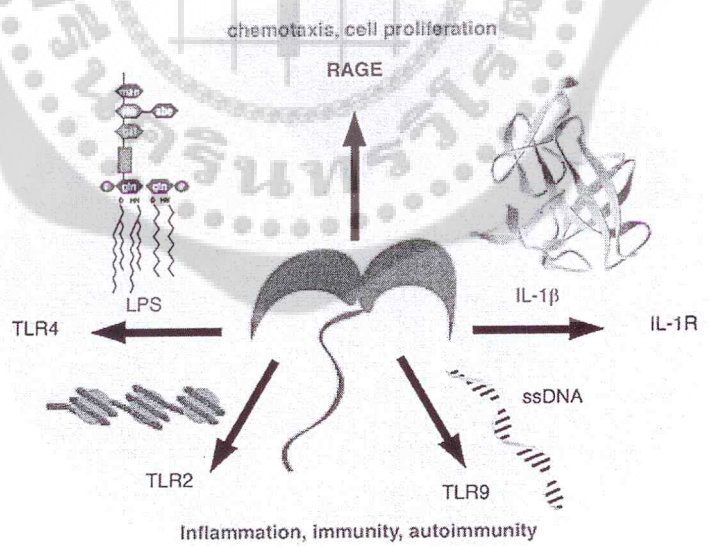
ตารางที่ 3 แสดงผลการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในสภาวะปกติและเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เอชเอ็มจีบี1 และกระตุ้นพร้อมกันทั้ง 2 ชนิด

Control กลุ่มควบคุมลบ
LPS กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส
HMGB1 กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1
LPS+HMGB1 กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ร่วมกับเอชเอ็มจีบี1

กล่าวโดยสรุปได้ว่า การกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เซลล์ทั้ง 2 ชนิดการตอบสนองโดยมีการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ในรูปแบบเดียวกันคือ มีการหลั่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดออกมาแตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญ($p<0.01$) และเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสและเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกัน เซลล์ทั้ง 2 ชนิดมีการหลั่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดออกมาแตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบ กลุ่มเอชเอ็มจีบี1 และกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) แต่เมื่อเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1เพียงอย่างเดียว จะมีการหลั่งไซโตไคน์และเมทริกเมทัลโลโปรตีเนส-1ออกมาไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ผลการแสดงออกในระดับเมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอไม่พบความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 หรือ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และเมื่อกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน

บทที่ 5
อภิปรายผลและบทสรุป

เอชเอ็มจีบี1 เป็นโปรตีนที่พบในนิวเคลียสและสามารถหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ มีการศึกษาว่าเอชเอ็มจีบี1 จะทำหน้าที่เสมือนเป็นไซโตไคน์ได้[2] โดยไปมีส่วนร่วมในพยาธิสภาพของการเกิดการอักเสบ หรือการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายได้ เช่น พบมีการหลั่งสารทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา ภายหลังทำการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ด้วยเอชเอ็มจีบี1[6] เป็นต้น อย่างไรก็ดี การศึกษาในระยะหลังยังพบอีกว่า ปริมาณสารไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาภายหลังกระตุ้นเซลล์ต่างๆด้วยเอชเอ็มจีบี1 ดูเหมือนจะมีปริมาณที่น้อยมาก[55] อีกทั้งยังตรวจพบว่ามีเอชเอ็มจีบี1 หลงเหลืออยู่ในรอยโรคที่แม้ว่าจะได้รับการรักษาให้ดีขึ้น เช่นพบปริมาณเอชเอ็มจีบี1ในพลาสมาในผู้ป่วยโรคปอดอักเสบที่ได้รับการรักษาแล้วถึง 176 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร[56] และไม่สามารถตรวจหาปริมาณเอชเอ็มจีบี1 ในพลาสมาได้ในภาวะปกติ จึงทำให้เห็นว่าบทบาทของของเอชเอ็มจีบี1 ในการเป็นไซโตไคน์ยังไม่เด่นชัดนัก การศึกษาในระยะต่อมาพบว่าเอชเอ็มจีบี1จะทำหน้าที่เสมือนเป็นไซโตไคน์ได้เมื่อมีการทำงานร่วมกับสารอื่นๆ เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ดีเอ็นเอสายเดี่ยว[57]ซึ่งสามารถสรุปได้ดังรูปที่15



รูปที่ 15 แผนผังแสดงบทบาทหน้าที่ของเอชเอ็มจีบี1เมื่อถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์และการทำงานที่ต้องร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์[57]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าเอชเอ็มจีบี1 ยังสามารถทำหน้าที่เสมือนโปรตีนช่วยจับกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ และทำให้เกิดการส่งสัญญาณต่อไปยังเซลล์ผ่านทางตัวรับโทล-ไลค์ 2, 4 ตัวรับสัญญาณแอดวานซ์ไกลเคชั่น[58] กระตุ้นให้เซลล์เกิดการหลั่งไซโตไคน์ขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเอชเอ็มจีบี1 สามารถทำหน้าที่แย่งจับกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ บายดิ้ง โปรตีนในการส่งสัญญาณให้กับเซลล์ ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ทดลองกระตุ้นเซลล์โดยมีเอชเอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรด์ก็จริง จึงอาจถือว่ามีการปนเปื้อนของบายดิ้งโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของโบวาย เซรั่ม อย่างไรก็ตามการวิจัยนี้ไม่ได้ทำการตรวจสอบการแย่งจับกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ระหว่างโปรตีนทั้ง 2 ชนิด เพียงแต่ได้ทดลองนำร่องความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์และเอชเอ็มจีบี1 ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์เท่านั้น ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในช่องปากมีการตอบสนองต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสในความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการกระตุ้นเซลล์ชนิดอื่นๆ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นที่ไม่แน่นอนของไลโปโพลีแซคคาไรด์บายดิ้ง โปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในโบวายเซรั่ม อย่างไรก็ตามพบว่าการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้นที่สูงจะสามารถยับยั้งผลในด้านลบของไลโปโพลีแซคคาไรด์ บายดิ้งโปรตีนได้[59]

ในทางทันตแพทยศาสตร์ ได้มีการวิจัยเกี่ยวกับบทบาทและความสำคัญของเอชเอ็มจีบี1 อยู่บ้างโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบ การวิจัยส่วนใหญ่มุ่งที่จะศึกษากับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ เนื่องจากเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่พบมากที่สุดในอวัยวะปริทันต์ ซึ่งมีหน้าที่หลักในการสร้างเส้นใยคอลลาเจนอันเป็นองค์ประกอบหลักของอวัยวะปริทันต์ นอกจากนี้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหล่านี้ก็สามารถหลั่งไซโตไคน์หรือเอ็นไซม์ต่างๆที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันได้ด้วย[60-62] ซึ่งเซลล์สามารถตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค เช่น พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส โดยมีการหลั่ง ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ได้[63,64] ซึ่งสนับสนุนว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์จะเป็นเซลล์ที่สำคัญในขบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์เช่นเดียวกับเซลล์ชนิดอื่นๆ[65]

จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะมีการหลั่งเอชเอ็มจีบี1 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส หรือเมื่อเกิดมีการตายของเซลล์ในเนื้อเยื่อไม่ว่าจะในรูปแบบเนคโครซิสหรือแบบอะพอพโตซิสก็ตาม[5,10] จึงเป็นที่น่าสงสัยว่า เอชเอ็มจีบี1 ที่ถูกหลั่งออกมานั้นจะมีผลอย่างไรต่อเซลล์ที่อยู่ในบริเวณรอยโรคนั้นๆอีก และทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ให้รุนแรงขึ้นด้วยหรือไม่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลของการใช้เอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ซึ่งเป็นปัจจัยก่อโรคที่มีความรุนแรงที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง ในการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ให้เกิดการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเอ็นไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 โดยเปรียบเทียบกับสภาวะที่ใช้การกระตุ้นด้วยสารอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการวัดปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ภายหลังการกระตุ้นเซลล์ที่เวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง โดยมีผลการวิจัยนำร่องที่แสดงการตรวจวัดปริมาณที่เวลาดังกล่าวที่ได้ผลดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการวัดภายหลังการกระตุ้นเซลล์ที่เวลา

ผ่านไปเพียง 24 ชั่วโมง

ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟาและอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้ามีส่วนสำคัญต่อการการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ โดยพบปริมาณไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้นในรอยโรคปริทันต์[28] น้ำเหลืองเหงือก[29] ซึ่งในการทดลองนี้พบปริมาณไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดเมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 มากกว่ากระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) ขณะที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ซึ่งสอดคล้องกับสมมุติฐานการวิจัยข้างต้นและสอดคล้องกับการวิจัยของ Qin และคณะในปี 2009 ทำศึกษาในเซลล์แมกโครฟาจของหนูพบทั้งการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ และการหลั่ง อินเตอร์ลิวคิน 6 ทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา และพบการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเออินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้าเมื่อกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของอีโคไลและเอชเอ็มจีบี1 แตกต่างจากกระตุ้นด้วยสารเพียงชนิดเดียว[58] ไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งเพิ่มขึ้นนั้นก็จะมีผลต่อเซลล์ในร่างกาย มีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบอินเนท ทำให้เซลล์มีการตอบสนองโดยมีการหลั่งไซโตไคน์และสารสื่ออักเสบต่างๆออกมาทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ อย่างไรก็ตามนอกจากไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดที่ได้ทำการศึกษาแล้ว ยังมีไซโตไคน์หรือเอนไซม์ตัวอื่นที่น่าสนใจศึกษาและมีบทบาทต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ที่ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมเช่น อินเตอร์ลิวคิน-6 รีเซบเตอร์ แอกติเวเตอร์ ออฟ นิวเคลียร์ แฟกเตอร์ แคปป้า บี (Receptor activator of nuclear factor kappa-B) โอพีจี (OPG) หรือตัวรับโทล-ไลค์ 1, 2, 4

เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 เป็นเอ็มไซม์ที่มีศักยภาพสูงในการทำลายเนื้อเยื่อ และเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ โดยสามารถพบมีการสร้างและหลั่งออกจากเซลล์บ้างอยู่แล้วในสภาวะปกติ[66,67] ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยครั้งนี้ โดยพบมีการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 เพียงเล็กน้อยในกลุ่มควบคุมลบที่ไม่ได้กระตุ้นเซลล์ด้วยสารใดๆเลย รวมถึงการที่พบมีการหลั่งเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 เพียงอย่างเดียวด้วย ในขณะที่พบมีการหลั่งของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ที่สูงมากขึ้น เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ทั้ง 2 ชนิดด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียว และยิ่งสูงมากขึ้นกว่าอีกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เมื่อกระตุ้นด้วยทั้ง 2 อย่างร่วมกัน

ซึ่งผลการวิจัยนี้น่าจะเป็นการสนับสนุนถึงการที่มีการตรวจพบทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเอ็นไซม์ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 นี้ได้ในรอยโรคปริทันต์อักเสบในปริมาณที่สูงกว่าที่พบในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่ปกติ[28,29,67] และยังเป็นการสนับสนุนผลการวิจัยที่ผ่านมาที่แม้จะศึกษากับเซลล์ของร่างกายชนิดอื่นๆ ก็ทำให้เชื่อได้มากขึ้นว่า เอชเอ็มจีบี1 จะสามารถทำหน้าที่เสมือนไซโตไคน์ได้ดี แม้กับเซลล์ในช่องปาก ก็จะต้องมีกลไกการทำงานที่ต้องร่วมกับสารโมเลกุลอื่น

ในการวิจัยนี้ นอกจากจะทำการวัดปริมาณทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเอ็นไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ด้วยเทคนิคอีไลซ่าแล้ว ยังทำการวิเคราะห์การแสดงออกในระดับยีนที่สร้างทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า เอ็นไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1 ของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยวิธีเรียลไทม์ รีเวอร์สทรานส์คริพเทส โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่นอีก

ด้วย ซึ่งในการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของเมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอนี้ ทำภายหลังการกระตุ้นเซลล์ที่เวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง เนื่องจากมีการวิจัยก่อนหน้านี้ มีการศึกษาในเซลล์โมโนไซต์พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอในเซลล์โมโนไซต์ในระดับที่สูง ภายหลังการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ที่เวลาผ่านไปแล้วเป็นเวลา 4 ชั่วโมง[7] อย่างไรก็ตาม ผลการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ ในเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ไม่ได้มีทิศทางที่เป็นไปในทิศทางดียวกันและไม่สอดคล้องกับการหลั่งโปรตีนทั้ง 3 ชนิดเท่าใดนัก ซึ่งอาจเกิดจากเทคนิคเรียลไทม์ รีเวอร์สทรานส์คริพเทส โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น และกระบวนการเก็บเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แต่อย่างไรก็ตามได้มีการทดลองนำร่องทำการศึกษาการแสดงออกของเมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์แอลฟา ที่ 4 ชั่วโมงพบว่าเซลล์มีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นสอดคล้องกับการหลั่งโปรตีน อนึ่งอาจเกิดจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีการตอบสนองที่แตกต่างกันโดยพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีการเพิ่มการแสดงออกของแมสเซ็นเจอร์ อาร์เอ็นเอ อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า ที่ 6 ชั่วโมงภายหลังการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส[64]

จากผลการแสดงออกที่ไม่เป็นทิศทางเดียวกันของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในครั้งนี้ อาจมีสาเหตุมาจากการที่เซลล์ไฟโบรบลาส์ทั้งสองชนิดมีที่อยู่ในเนื้อเยื่อ มีหน้าที่และมีคุณลักษณะธรรมชาติของเซลล์ที่แตกต่างกัน เช่น เซลล์ทั้งสองนี้มีการแสดงออกของออสติโอแคลซิน หรือโบนไซอะโลโปรตีน รวมถึงอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแตกต่างกัน[68] โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มีการแสดงออกของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปริมาณที่สูง[69] ทำให้สามารถผลิตสารคล้ายโปรตีนเมทริกซ์ของกระดูก และสามารถสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (mineralized nodules) ได้ดีกว่า ในขณะที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกมีการแสดง ออกของตัวรับซีดี 14 ที่สูงกว่า จึงอาจทำให้เซลล์ทั้งสองนี้มีการแสดงออกเพื่อตอบสนองการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ได้แตกต่างกัน อนึ่งในการวิจัยนี้ ใช้เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกและจากเอ็นยึดปริทันต์จากผู้ป่วยรายเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบจะพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์จะมีการแสดงออกของแมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอที่ผลิตเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ได้มากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือก ทั้งในสภาวะปกติและเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิด ไม่ว่าจะเป็นการกระตุ้นร่วมหรือกระตุ้นเพียงอย่างเดียว

จากการวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าเอชเอ็มจีบี1 สามารถเพิ่มการหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-1ได้เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส

การอ้างอิง

1. Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem.* 1973;21:14-19

2. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 1999;285:248-251.

3. Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression.*Curr Opin Genet Dev.* 2003;13:170-8

4. Nuntasenee K, Loasrisin N, Dhanesuan N. In Vitro effect of LPS on HMGB1 expression in Human Periodontal Ligament Fibroblast. *Thai Pharm Health Sci J.* 2011; 6:175-81.

5. รุ่งทิวา ปันป่า, ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, นิรดา ธเนศวร. การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์. ปริญญานิพนธ์ ปริทันตวิทยา, 2009

6. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med.* 2000;192:565-570.

7. Jiang W, Pisetsky DS. Mechanisms of Disease: the role of high-mobility group protein 1 in the pathogenesis of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007;3:52-58.

8. Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. J *Intern Med.* 2004;255:344-50

9. Morimoto Y, Kawahara K-I, Tancharoen S, Kikuchi K, Matsuyama T, Hashiguchi. Tumor necrosis factor-alpha stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1. *J Periodontal Res.* 2008;43:76-83

10. Feghali K, Iwasaki K, Tanaka K, Komaki M, Machigashira M, Ishikawa I, Izumi Y. Human gingival fibroblasts release high-mobility group box-1 protein through active and passive pathways. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:292-298.

11. Huang W, Tang Y, Li L. HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis. *Cytokine.* 2010;51:119-126

12. Charoonpatrapong K, Shah R, Robling AG, Alvarez M, Clapp DW, Chen S, et al. HMGB1 expression and release by bone cells. *J Cell Physiol.* 2006;207:480-490

13. Erlandsson Harris H, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol.* 2004;34:1503-1512

14. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen J-X, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, Morser J, Stern D, Schmidt AM.The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-

expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem.* 1995;270:25752-25761

15. Youn JH, OH YJ, Kim ES, Choi JE,Shin JS. High Mobility Group Box 1 Protein Binding to Lipopolysaccharide Facilitates Transfer of Lipopolysaccharide to CD14 and Enhances Lipopolysaccharide-Mediated TNF-α Production in Human Monocytes.*J Immunuol.* 2008, 180: 5067–5074.

16. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol.* 2005;78:1-8.

17. Lutz W, Stetkiewicz J. High mobility group box 1 protein as a late-acting mediator of acute lung inflammation. *Int J Occup Med Environ Health.* 2004;17:245-254

18. Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. Scand *J Immunol.* 2005;61:1-9

19. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumor growth and metastases. *Nature.*2000;405:354-360

20. Merenmies J, Pihlaskari R, Laitinen J, Wartiovaara J, Rauvala H. 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *J Biol Chem* 1991; 266: 16722-16729

21. Taylor J. Cytokine regulation of immune response to Porphyromonas gingivalis. *Periodontal 2000.* 2010;54:160-94.

22. Granger GA, Shacks, S.J., Williams, T.W., and Kolb, W.P. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature.* 1969;221:1155-1157.

23. Carswell EA, Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975;72:3666-3670

24. Ware CF. The TNF Superfamily-2008. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2008;19:183-186

25. Goldfeld A, Tsai E. TNF-alpha and genetic susceptibility toparasitic disease. *Exp Parasitol.* 1996;84:300-303

26. Krueger JM FJ, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi J. . Sleep.A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;856:148-159

27. Wride MA SE. Potential roles for Tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat Embryol.* 1995;191:1-10

28. Rossomando EF KJ, Hadjimichael J. Tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Arch Oral Biol* 1990;35:431-4

29. Lee H, Kang I, Chung C, Choi S. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1995;22:885-90

30. Roberts FA MK, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adults periodontitis. *J Dent Res.*1997;76:1833-1839

31. Vilcek J LT. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem.*1991;266:7313-7316

32. Hanemaaijer R KP, Le Clercq L, de Vree WJ, Van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J.* 1993;296:803-809

33. Hanemaaijer R ST, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline.*J Biol Chem* 1997;272: 31504-31509

34. Johansson N WJ, Leppa S, Hakkinen L, Koivisto L,Lopez-Otin C, et al. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) gene expression by HaCaT keratinocytes is enhanced by tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta. *Cell Growth Differ.* 1997;8:243-50

35. Uitto V, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins E, Firth J, et al. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol.* 1998;152:1489-1499

36. Hofbauer LC. Lacey D. L., Dunstan C. R., Spelsberg T. C., Riggs B. L., Khosla S. Interleukin-1b and tumor necrosis factor-a,but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone.* 1999;25:255-259

37. Horwood NJ, Elliott, J., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. . Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology.* 1998;139:4743-4746.

38. Wang P, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:1161-1167

39. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves D. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;160:403-409

40. Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:305-315

41. Richards. D, Rutherford RB. The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblast. *Arch Oral Biol* 1988;33:237–243

42. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser M, Prostak L, Haffajee A, Socransky S. Levels of interleukin-1β in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1991;18:548-554

43. Ohshima M, Otsuka K, Suzuki K. Interleukin-I beta stimulates collagenase production by cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1994;29:421-429

44. Harada. O, Suga T, Suzuki T, Nakamoto K, Kobayashi M, Nomiyama T, et al. The role of trophin in, an adhesion molecule unique to human trophoblasts, in progression of colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2007;121:1072-1078

45. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993:474–484

46. Irwin C, Schor S, Ferguson M. Effects of cytokines on gingival fibroblasts in vitro are modulated by the extracellular matrix. *J Periodontal Res.*1994;29:309-317

47. Liu YC, Lerner UH, Teng YT.Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000.* 2010;54:163-206.

48. Westerlund U, Ingman T, P-L Lukinmaa. Human neutrophil gelatinase and associated lipokalin in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res.* 1996;75:1553-1563

49. Aiba T, NAkeno, Kawane T, Okamoto H, Horiuchi N. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:562-569.

50. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix Metalloproteinases: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4:197-250.

51. CHEN DY, LAN JL, LIN FJ, HSIEH TY. Proinflammatory Cytokine Profiles in Sera and Pathological Tissues of Patients with Active Untreated Adult Onset Still's Disease.J Rheumatol. 2004:11;2189-98

52. Zhang Y, Ba Y, Liu C, Sun G, Ding L, Gao S, Hao J, Yu Z, Zhang J, Zen K, Tong Z, Xiang Y, Zhang C-H.PGC-1α induces apoptosis in human epithelial ovarian cancer cells through a PPARγ-dependent pathway. *Cell Research.* 2007;17: 363–373

53. Xu S, Lu H, Lin J, Chen Z, Jiang D.Regulation of TNFa and IL1b in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by leukotriene B4. *Rheumatol Int.*2010:30;1183–1189.

54. Takemura A ,Nakagawa I,Kawai S, Inaba H, Kato T, Hamada S, Amano A. Inhibitory Effects of Tumor Necrosis Factor-Alpha on Migration of Human Periodontal Ligament Cells. *J Periodontol* .2006;77: 883-890.

55. Rouhiainen, A., Tumova S, Valmu L,. Kalkkinen N, Rauvala H. Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin). *J Leukoc Biol.* 2007;81: 49–58.

56. Angus DC , Yang L , Kong L , Kellum JA , Delude RL , Tracey KJ , Weissfeld L. Circulating high-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations are elevated in both uncomplicated pneumonia and pneumonia with severe sepsis. *Crit Care Med.*2007;35:1061-7

57. Bianchi M.E. .HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol* .2009;86:573-576

58. Qin Y-H, Dai S-M, Tang G-S, Zhang J, Ren D, Wang Z-X, Shen Q.Hmgb1 enhances the proinflammatory activity of lipopolysaccharide by promoting the phosphorylation of MAPK p38 through Receptor of Advance Glycation End Products.*J Immunol.* 2009;183:6244-6250

59. Ren L,Jiang ZQ, Fy Y,Leung WK, Lin L J. The interplay of lipopolysaccharide binding protein and cytokine in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol.* 2009;36:619–626.

60. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology.* 1992;76:42-47.

61. Takada H, Mihara JI, Morisaki I, Hamada S. Induction of interleukin-l and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with Bacteroides lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 1991;59:295-301.

62. Shimizu N, Ogura N, Yamaguchi H. Stimulation by interleukin-l of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.*1992;37:743-748.

63. Scheres N, Laine M.L., Sipos P.M., Bosch-Tijhof C.J., Crielaard W, De Vries T.J., Everts V. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with Porphyromonas gingivalis. *J Periodont Res.* 2011;46: 407–416

64. Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, Van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable Porphyromonas gingivalis. *J Periodont Res.* 201045, 262–270

65. Jonsson D. Nebel D. Bratthall G, Nilsson B-O. (2011). The human periodontal ligament cell: a fibroblastlike cell acting as an immune cell. *J Periodont Res.* 2010;46:153–157

66. Dong W, Xiang J, Li C, Cao Z, Huang Z. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer is associated with matrix metalloproteinase-1 and -2 in gingival tissues from patients with periodontitis. *J Periodont Res.* 2009;44:125–132.

67 Cao Z, Li C, Xiang J. Effect of matrix metalloproteinase-1 promoter genotype on interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-1 production in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res.* 2010;45: 109–1

67. Ingman T,Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Konttinen YT, Sorsa T.. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1996;23:1127-1132

68. Hatakeyama J,Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S and Takada H. Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system.*Oral Microbiol Immunol.* 2003;18: 14-23

69. Wang PL, Azuma Y, Shinohara M ,et al. Toll-like Receptor 4-Mediated Signal Pathway Induced by Porphyromoans gingivalis Lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273:1161-1167

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อผู้วิจัย (ไทย) รศ.ทพ.ดร. ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน

(อังกฤษ) Narongsak Laosrisin, Assoc.Prof.Dr.

หมายเลขประจำตัวบัตรประชาชน 3100601206456

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ได้รับเงินเดือนระดับ 9 ขั้น เลขประจำตำแหน่ง 2261

สถานที่ติดต่อ คณะทันตแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สุขุมวิท 23 แขวงคลองเตย เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110

โทร 02 6641000 ต่อ 5112

ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานที่ศึกษา
ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต	2528	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย
Cert in Japanese language	2528	Osaka University of Foreign Studies, Japan
Cert in Periodontology	2529	Tokyo medical and Dental University, Japan
Ph.D. in Dental Science	2533	Tokyo medical and Dental University, Japan
อนุมัติบัตรแสดงความรู้ความสามารถในการประกอบวิชาทันตกรรม สาขา ปริทันตวิทยา	2539	ทันตแพทยสภา, ประเทศไทย

สาขาวิชาที่มีความชำนาญ: สาขาปริทันตวิทยา

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

1. Narongsak Laosrisin, Keisuke Nakashima and Isao Ishikawa: Detection of Bacteroides gingivalis antigenic proteins by immunobloting analysis. The Journal of Periodontology. 1990; 61(5): 261-268
2. Isao Ishikawa, Makoto Umeda and Narongsak Laosrisin: Clinical, Bacteriological, and Immunological Examinations and Treatment Process of Two Papillon Lefevre Syndrome Patients. The Journal of Periodontology. 1994; 65(4): 364-371

3. Elizabeth A. Boutsi, Makoto Umeda, Narongsak Laosrisin and Isao Ishikawa:Follow-up of Two Papillon Lefevre Syndrome and Presentation of Two New Cases. The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry. 1997; 17(4): 335-347
4. ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, ดวงรัตน์ ครองระวะ และ นุชจรี พงษ์นริศร 2535, "การเปลี่ยนแปลงสภาวะปริทันต์ภายหลังการรักษาในระยะเริ่มแรก" วารสารทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 15(3) หน้า 187 - 192
5. ชิตนี วีรปริดิษฐ์ศิลป, ศิริพร รัตนเชตกุล, สุรสา ตั้งใจตรง และณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน 2535, "ความรู้ และ ทัศนคติเกี่ยวกับโรคปริทันต์ ของผู้ป่วยที่มารับบริการ ในแผนกทันตกรรมของโรงพยาบาลรัฐบาล และโรงพยาบาลเอกชน ในเขตกรุงเทพมหานคร" วารสารทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 15(2) หน้า 113-128
6. จินตกร คูวัฒนสุชาติ และ ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน 2541, การตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยด้วยโรคปริทันต์อักเสบในคนไทย วารสารทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 21(1) หน้า 31 – 35
7. ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน จิติมา เอื้อรัตนวงศ์ บูรยา เปล่งสงวน วิมลพรรณ นนทรี และ ลลนา คงคาเนรมิตร, การพัฒนายาในกลุ่มเซฟาโลสปอริน (Cephalosporins) ในรูปแบบเจลเพื่อการรักษาผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ (กำลังดำเนินการเผยแพร่)
8. พลภัทร์ จรัสชัยวรรณา ดวงพร ศรีสุภาพ และ ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, ความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และชนิดของฟิมเบรียในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบคนไทย
9. กนิษฐ์ นันทเสนีย์ นิรดา ธเนศวร และ ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, ผลของ E.coli LPS ต่อการแสดงออกของ HGMB-1 ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ (Effect of LPS on HGMB 1-expression in human periodontal ligament fibroblast)
10. ศรินทิพย์ อังศุโภไคย สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล และ ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, การแสดงออกของพาร์-2 ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์ (Expression of PAR-2 in Human periodontal ligament cells activated by Periodontopathic bacteria)
11. ผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางคลินิกและทางจุลชีววิทยาภายหลังการรักษาโรคปริทันต์อักเสบด้วยเครื่องขูดใต้เหงือกอัลตร้าโซนิกร่วมกับน้ำยาบ้วนปากประเภทเอสเซ็นเชียลออล์ย (Clinical and microbiological change in periodontal treatment by subgingival ultrasonic debridement conjugated with essential oil mouth rinse.) (กำลังดำเนินการเผยแพร่)
12. ผลของเคอร์คิวมินต่อการแสดงออกของ iNOS,TNF-α และIL-1β ในหนูเบาหวานที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นโรคปริทันต์อักเสบ (Effect or Curcumin on the expression of iNOS, TNF-α and IL-1β in periodontitis-induced diabetic rats) (กำลังดำเนินการเผยแพร่)
13. รุ่งทิวา ปันป่า นิรดา ธเนศวร และ ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ เมื่อกระตุ้นเชื้อก่อโรคปริทันต์

(HMGB1 Expression in Human Gingival and PDL Fibroblast Activated by periodontopathic bacteria) (กำลังดำเนินการเผยแพร่)

บทความทางวิชาการ

1. Loasrisin N: Chapter 11th - Progress of periodontal research and practice in Thailand. In: Bartold PM, Ishikawa I, Sirirat M, editors. Progress of periodontal research and practice in the Asain Pacific country. Proceedings of the 3rd Asain Pacific Society of Periodontology Meeting. Bangkok, Thailand, 1999, p.109-115.
2. Loasrisin N: Chapter 5 th - Conservative periodontal therapy as a predictable procedure in Thailand. In: Bartold PM, Ishikawa I, Taiyeb Ali TB, editors. New millennium challenges in periodontology in the Asain Pacific region. Proceedings of the 4th Asain Pacific Society of Periodontology Meeting. Kuala Lumpur, Malaysia, 2001; 43-54
3. Loasrisin N: Chapter 8 th - Clinical application of current research in periodontal pharmacotherapeutics. In: Bartold PM, Ishikawa I, Arunachalam D, editors. Reshearch advances and periodontics : Bridging the gap. Proceedings of the 6th Asain Pacific Society of Periodontology Meeting. Chennai, India, 2005; 60-82
4. สุรศักดิ์ บุญญาศิริรัตน์, ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน 2535, "สารรักษาภาวะไวต่อความรู้สึกของฟัน" วารสารทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 15(2) หน้า 151-161
5. ฐิติพร พานโพธิ์ทอง, ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน 2535, "การตัดแบ่งครึ่งฟันปละการตัดรากในฟันที่มีรอยโรคบริเวณช่องรากฟันกราม" วารสารทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 15(3) หน้า 221-232
6. ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน 2535, "การวินิจฉัยโรคปริทันต์แนวใหม่" วิทยาสารทันตแพทยศาสตร์ ทันตแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ 42(4) หน้า 194 –205

<u>การเสนอผลงานและการได้รับเชิญเพื่อเผยแพร่ชื่อเสียงของมหาวิทยาลัย</u>

1. ตัวแทนประเทศไทย ในการประชุม Asian Pacific Society of Periodontology Meeting ครั้งที่ 3 และเสนอผลงานวิจัย เรื่อง The Progression of Periodontal Research and Practice in Thailand ปี พ.ศ. 2542 กรุงเทพฯ ประเทศไทย
2. ตัวแทนประเทศไทย ในการประชุม Asian Pacific Society of Periodontology Meeting ครั้งที่ 4 และเสนอผลงานวิจัย เรื่อง Conservative periodontal therapy as a predictable in Thailand วันที่ 24-25 กันยายน พ.ศ. 2544 กรุงกัวลาลัมเปอร์ ประเทศมาเลเซีย

3. เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ International Association for Dental Research ครั้งที่ 83 เรื่อง Development of Cephalosporin Oral Gel for Periodontal Treatment วันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2548 ณ กรุงบัลติมอร์ ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. ตัวแทนประเทศไทย ในการประชุม Asian Pacific Society of Periodontology Meeting ครั้งที่ 6 และเสนอผลงานวิจัย เรื่อง Clinical application of current research in periodontal pharmacotherapeutics วันที่ 4 พฤศจิกายน พ.ศ. 2548 กรุงChennai ประเทศอินเดีย
5. ตัวแทนประเทศไทย ในการประชุม Euro Perio 5 จัดโดย European Society of Periodontology Meeting ครั้งที่ 5 และเสนอผลงานวิจัย เรื่อง Recent progress in the field of periodontology in Thailand วันที่ 29 มิถุนายน พ.ศ. 2549 กรุงMadrid ประเทศสเปญ
6. เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ American Academy of Periodontology ครั้งที่ 92 เรื่อง Periodontal destruction pattern and immunolocalization of TNF-α and iNOS in streptozotocin-induced diabetes rats (Abstract No. 5008) วันที่ 18 กันยายน พ.ศ. 2549 ณ เมืองซานดิเอโก ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ European Society of Periodontology Meeting ครั้งที่ 6 และเสนอผลงานวิจัย เรื่อง Clinical and microbiological change in periodontal treatment by subgingival ultrasonic debridement conjugated with essential oil mouth rinse วันที่ 4-5 มิถุนายน พ.ศ. 2552 ประเทศสวีเดน
8. เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ Asia pacific society of periodontology ครั้งที่ 8 เรื่อง subgingival ultrasonic debridement : mission possible วันที่ 29 สิงหาคม พ.ศ. 2552 ประเทศสิงคโปร์