ผลของเอชเอ็มจีบี 1 ต่อการเพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

HMGB1 effect on proliferation and migration of gingival and periodontal ligament fibroblasts

โดย

ผศ.ทพญ.ดร.นิรดา ธเนศวร

รศ.ทพ.ดร.ณรงศักดิ์ เหล่าศรีสิน

อ.ทพญ.รุ่งทิวา ปันป่า

ทุนอุดหนุนวิจัย รายได้มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2553

Abstract

HMGB1 was originally identified as a nuclear protein with its major role involving transcriptional regulation. Recently, studies showed many interesting extracellular activity of HMGB1 as a pro-inflammatory cytokine as well as its role as a chemotactic agent and cell proliferation regulation in various cell types. These properties had made HMGB1 an important molecule in many inflammatory diseases. Periodontal disease is one of the most common inflammatory oral diseases which resulted in destruction of periodontal tissue. In this study, we treated HMGB1 to primary human gingival fibroblast (HGF) and periodontal ligament fibroblast (HPDLF) and determined their proliferation and migration responses. HMGB1 at 50 ng/ml induced proliferation of HGF but not HPDL after 6 days treatment as determined by MTT assay. Transwells experiment revealed HMGB1 to be chemotactic to both HGF and HPDLF. The cell numbers across the membrane was increased up to 273 and 410% for HGF and HPDLF respectively. Since proliferation and migration are both crucial properties for tissue repair, HMGB1 seems to be a promising molecule for periodontal repair and regeneration. However, since HMGB1 also contained a pro-inflammatory activity , further studies are required in order to understand its molecular mechanism of regulation before it can be utilized successfully in a clinical situation.

บทคัดย่อ

เอชเอ็มจีบี1 ถูกค้นพบโดยการเป็นโปรตีนในนิวเคลียสที่มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน การศึกษาในระยะหลังแสดงถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี1 ที่อยู่ภายนอกเซลล์ ทั้งในด้านการเป็นสารอักเสบ หรือผลต่อการเคลื่อนที่และการเพิ่มจำนวนในเซลล์หลายชนิด เอชเอ็มจีบี1 จึงมีบทบาทสำคัญในโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่าง ๆ โรคปริทันต์เป็นโรคที่มีการอักเสบภายในช่องปากที่พบได้บ่อย ส่งผลต่อการทำลายอวัยวะปริทันต์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ โดยติดตามการตอบสนองในด้านการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ เอชเอ็มจีบี1 ในขนาด 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก แต่ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ เมื่อทำการวัดผลด้วยวิธีเอ็มทีที การทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วยทรานส์เวลล์พบว่าเอชเอ็มจีบี 1 ส่งผลกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยทั้ง 2 ชนิด จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่านเมมเบรนมีจำนวนเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 273 และ 410 สำหรับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ตามลำดับ เนื่องด้วยการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่เป็นคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับเซลล์ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ เอชเอ็มจีบี1 จึงเป็นโมเลกุลที่น่าสนใจต่อการซ่อมแซ่มและสร้างเนื้อเยื่อปริทันต์ใหม่ อย่างไรก็ตามจากการที่เอชเอ็มจีบี1 มีคุณสมบัติในการเป็นสารอักเสบร่วมด้วย การศึกษาถึงกลไกระดับโมเลกุลในการควบคุมการแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1 จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อการประยุกต์ใช้เอชเอ็มจีบี1 ในทางคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

Acknowledgement

First of all, we would like to thank Srinakarinwirot University for the sponsorship for this research. As most of our research team is not an experienced researcher, getting this grant was a very important step for us to get started, to gain experiences and be able to create more works in the future. We are very grateful for this opportunity you gave to us.

There are many people involved and helped us through with this work. Thanks to all staffs in Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University for their supports. A special thanks goes to staffs in Deparment of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, for their all-time useful suggestions and comments.

Finally, thanks to all families and friends and other unnamed helping hands in this work.

Table of contents

Chapter	Page
1. Introduction	1
2. Reviewed literature	3
3. Material and methods	5
4. Results	7
5. Conclusion	10
Bibliography	12
VITAE	16

List of illustrations

Figure	Page
1. Proliferation assay by MTT analysis in HGF and HPDLF	8
2. Migration assay by transwell method for HGF and HPDLF	9

Chapter 1

Introduction

HMGB1, so called amphoterin, was discovered over 30 years ago as a nuclear protein (1). For a long time its major role involved maintaining nucleosome structure and regulation of gene transcription. HMGB1 consists of two consecutive L-shaped domains (called HMG boxes) and a 30 amino acid-long acidic 'tail' connected by short linkers. HMGB1 is amongst the most ubiquitous, abundant and evolutionarily conserved protein in eukaryotes (2,6). It shares 100% amino acid sequence between mouse and rat, and 98% between rodent and human (3). Later studies showed extracellular role of HMGB1 as a proinflammatory cytokine. This role has opened up a new field of research of HMGB1 role in inflammatory diseases (2-4).

HMGB1 can be secreted by some cell types. It can be actively released by macrophages/ monocytes in response to stimulation with exogenous bacterial endotoxin e.g. lipopolysaccharide (LPS) or endogenous proinflammatory cytokines (2-4). In addition to being actively released from activated innate immune cells, HMGB1 can also be passively released from necrotic or damaged cells. Once released, HMGB1 is able to activate several other cells involved in the immune response or inflammatory reaction. Therefore, HMGB1 might be a critical molecule that allows innate immune cells both to response to injury, and to further induce inflammation (4,5). The cytokine activity of HMGB1 has been well-documented in many cell types and tissues (6,7) such as macrophages/monocytes, endothelial cells, neutrophils, epithelial cells, dendritic cells, smooth muscle cells, brain, lung, joint and etc. More recently, HMGB1 has shown its ability to recruit cells and promote regeneration in many tissues such as heart, skeletal muscle and skin wound (7).

HMGB1 has an important role in several acute and chronic inflammatory diseases. However evidence of HMGB1 role on oral diseases is still limited. Gingivitis and periodontitis are common infectious oral diseases that led to inflammation of the gingiva and destruction of periodontal tissues. Attempts had been made to repair and regenerate these destroyed tissues. Proliferation and migration are important properties of the cells in order to repair and regenerate. In this study, we aimed to investigate the effect of HMGB1 on proliferation and migration of human gingival and periodontal ligament fibroblasts.

Chapter 2

Reviewed literature

In structure, HMGB1 consists of two consecutive L-shaped domains (called HMG boxes) and a 30 amino acid-long acidic 'tail' connected by short linkers (6,9). Later studies showed extracellular role of HMGB1 as a proinflammatory cytokine (2-4,6). This role has opened up a new field of research of HMGB1 role in inflammatory disease such as sepsis, acute lung injury and arthritis (4,10,21).

HMGB1 can be secreted by some cell types. It can be actively released by macrophages/ monocytes in response to stimulation with exogenous bacterial endotoxin e.g. lipopolysaccharide (LPS) or endogenous proinflammatory cytokines eg. tumour necrosis factor (TNF), interleukin 1β (IL-1β) and interferon gamma (IFN)-γ) (8,9). In addition to being actively released from activated innate immune cells, HMGB1 can also be passively released from necrotic or damaged cells (2,5,6). Once released, HMGB1 is able to activate several other cells involved in the immune response or inflammatory reaction. Therefore, HMGB1 might be a critical molecule that allows innate immune cells both to respond to injury, and to further induce inflammation (3,4,6,9). HMGB1 has been termed as a late mediator of endotoxin lethality, because its releasing is delayed by several hours compared with other proinflammatory cytokines that mediate shock and tissue injury (10). The cytokine activity of HMGB1 has been well-documented in many cell types and tissues such as macrophages/monocytes, endothelial cells, neutrophils, epithelial cells, dendritic cells, smooth muscle cells, brain, lung, joint and etc (6,9).

Apart from its cytokine activity, recent studies showed the ability of HMGB1 to affect cell proliferation as well as migration. This ability resulted in promoting tissue regeneration

in several systems. Ranzato et al. 2009 showed HMGB1 stimulate keratinocyte proliferation and promote cell migration in a transwell experiment. It also accelerated *in vitro* wound closure in a scratch wound assay (11). Palumbo et al. 2004 reported extracellular HMGB1 induced both migration and proliferation of vessel-associated stem cells (mesoangioblasts) and played a role in muscle tissue regeneration (12). Decreased expression of T160, a member of HMGB1 group, by antisense RNA resulted in an impairment of mouse fibroblasts proliferation, providing evidence of its involvement in a basic cell function (13). For human mesenchymal stem cells, HMGB1 inhibited cell proliferation but promoted their migration and differentiation into osteoblast (14). HMGB1 was also important for skin wound repair. In vitro, it had chemotactic activity to skin fibroblasts and keratinocytes. Application of topical HMGB1 to the wounds enhanced arterile density, granulation tissue deposition and accelerated wound healing in diabetic mice experiment (15). Furthermore, HMGB1 was shown to stimulate several cells migration including human dendritic cells (8), rat smooth muscle cells (17), human monocyte (20), mouse neuroblastoma, mouse myoblast, mouse melanoma, rat glioma and human fibrosarcoma (18).

Chapter 3

Material and methods

Cell culture and reagent

Human gingival and periodontal ligament fibroblasts (HGF and HPDL) were obtained from caries-free third molars extracted for orthodontic reasons at the Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University with the patients' informed consent. The teeth were washed with sterile phosphate buffer saline (PBS) several times. The gingival tissues were gently removed from cervical area and the periodontal tissues were scraped from middle third of the roots by sterile surgical blades. HGF and HPDL were cultivated in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (10%FCS-DMEM), 2mM L-glutamine, 100IU /ml penicillin G, 100 IU/ml streptomycin. Cultures were maintained at 37 °C in 5% CO_2. The medium and all supplements were from Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA). HGF and HPDL were prepared from 3 donors and cells from passage 3 were used in the experiments. This study had been approved by the Research Ethic Committee, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University. Human recombinant HMGB1 (rHMGB-1) were purchased from Sigma, USA, solubilized in sterile distilled water and kept at -20 °C until used.

Proliferation assay by MTT method

Cells (3,000 per well) were plated in 96-well-plates in 10% FCS-DMEM overnight to allow attachment. The next day, wells were washed 3 times with media and changed to serum-free DMEM (SF-DMEM). rHMGB-1 were treated to the cells at 1, 5, 10 and 50 ng/ml (3 wells per treatment). Sterile distilled water was used as a negative control. On day 6, media were changed to fresh DMEM (100 µl per well). Ten µL of MTT solution (5 mg/ml in

PBS) was added to each well and incubated for an additional 30 minutes at 37°C 5% CO_2. The colored formazan product was then dissolved in 100 µL of DMSO and optical density read at 550 nm. Cells number was calculated according to a standard curve of cell numbers and converted to cell percentage (100% for control group) before analyzing the datas.

Migration assay

Cell migration assay was performed in Transwell chambers (6.5 mm in diameter, pore size: 8 µm, Corning Life Sciences, U.S.A). Cells were harvested using PBS-EDTA buffer and resuspended in DMEM containing 1% fetal calf serum (1% FCS-DMEM). The amounts of 120,000 cells were put into upper chamber of a 24-transwell chemotaxis chamber. rHMGB-1 was dissolved in 1% FCS-DMEM and put into the lower chamber (100 ng/ml in 500 µl media). Fibroblast conditioned media were used as a positive control and steile distilled water in 1% FCS-DMEM was used as a negative control. The cultures were maintained at 37°C 5% CO_2 for 16 hours. Cells on the upper surface of the membrane were removed with a cotton swab and cells migrated to the lower side were fixed with 4% formaldehyde and stained with 0.1% crystal violet. The membrane was visualized under 40X magnification of inverted microscope. Cell count was performed using Motic image analysis program. Four representative fields of vision were selected for each membrane. The experiment was performed 3 times separately.

Statistically analysis

Data were presented as mean± SD of triplicate assay. The statistical differences were analyzed by one-way ANOVA. Student's t-test was used for paired comparisons. A p-value of less than 0.05 was considered to be significant.

Chapter 4

Results

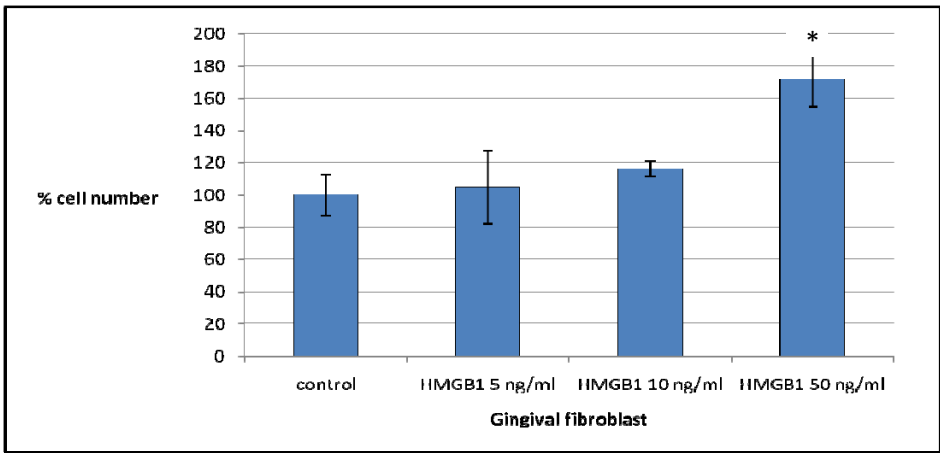
HMGB1 induced HGF proliferation but not HPDLF

As shown in figure 1, HMGB1 at 50 ng/ml significantly induced proliferation of HGF as determined by MTT assay at day 6. HGF was increased to 171% percent in cell numbers as compared to the control (1A). HPDLF, however, did not show any changes in cell number as compared to the control group (1B).

HMGB1 induced migration of HGF and HPDLF

As shown in figure 2, HMGB1 at 100 ng/ml clearly showed migratory stimulation of all the 2 cell types. HGF and HPDLF were strongly induced as seen by cell number across the membrane of up to 273 and 410 percent for HGF and HPDLF respectively.

1A



1B

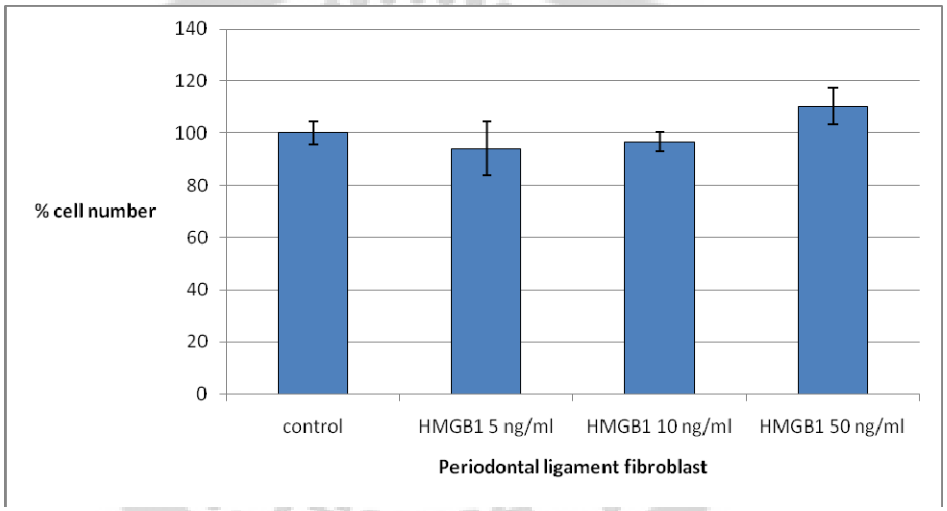


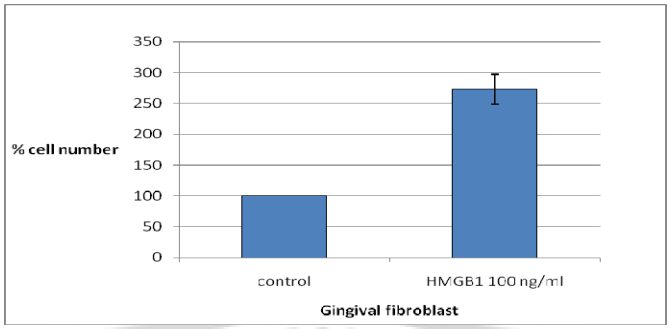
Figure 1 Proliferation assay by MTT analysis in HGF (1A.) and HPDLF (1B.)

Cells (3,000 per well) were plated overnight in a 96-well-plate. The next day, conditioned media were changed to SF-DMEM (100 ul/well). HMGB1 was treated to the cells at concentrations of 5, 10 and 50 ng/ml. Sterile distilled water was used as a control. After 6 days, cultured media were discarded and MTT assay was performed. (* means statistically significant at p-value < 0.05)

2A

Negative control HMGB1 100 ng/ml

2B



2C

Negative control HMGB1 100 ng/ml

2D

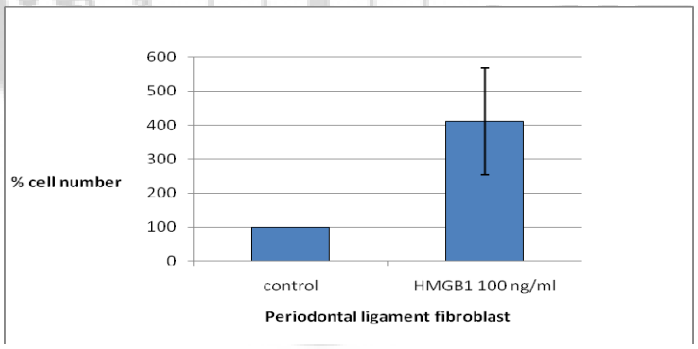


Figure 2 Migration assay by transwell method for HGF (2B.) and HPDLF (2D.)

Cells (120,000) were plated into the upper chamber of 6.5 mm transwell (8 um in pore size). Five hundred ul of chemoattractant (100 ng/ml of HMGB1) dissolved in 1%FCS-DMEM was put in the lower chamber. Sterile distilled water in 1%FCS-DMEM was used as a negative control and fibroblast conditioned medium was used as a positive control (data not shown). After 16 hours, cells on the upper side were wiped off and cells on the lower chamber fixed by methanol and stained with 0.1% crystal violet. 2A and 2D were example of the stained membrane under 40x magnification power of inverted microscope for HGF and HPDLF respectively.

Chapter 5

Conclusion

HMGB1, originally defined as a nuclear protein, is now widely accepted as an important molecule extracellularly (2-4,6,9). Its major roles included proinflammatory cytokine as well as its effect on cells behaviors eg. proliferation and migration in various cells. In the study, we used 2 cell types, namely HGF and HPDLF, in order to represent periodontal tissues response to HMGB1. Periodontal disease is one of the most common oral diseases. It involved destruction of periodontium originating from inflammation of gingival tissue to loss of the tooth from its socket in the end. Attempts had been made to repair and regenerate these tissues including utilizing of specific bioactive substance or surgical bone graft etc. (22)

Many studies revealed HMGB1 is secreted from many types of cells under stressed condition (2,5,7,9). Once released extracellularly, HMGB1 in turn affected cells behaviors in several ways including cell proliferation and migration. It induced proliferation of keratinocyte, mesoangioblast (11,12). On the contrary, proliferation inhibition was also seen in human mesenchymal stem cell (14). For migration, however, reports had mostly been shown on a stimulatory effect in skin fibroblast, mesoangioblast, human mesenchymal stem cell, human dendritic cell etc (12,14,15,16).

In our present study, the 2 cell types showed different responses to HMGB1 in terms of proliferation. Only HGF showed proliferation stimulation by HMGB1.The difference between the 2 fibroblast lines was not surprising. Although both being fibroblast in nature, evidences supported some characteristic differences between the 2 lines. Somerman et al. 1988 compared *in vitro* character of the human gingival and periodontal ligament fibroblast.

Although both harboring the ability to stimulate periodontal regeneration, some differences in terms of protein pattern, collagen production and alkaline phosphatase activity (23). However, the 2 cells showed migratory stimulation by HMGB1.

Since proliferation and migration are both essential properties for cells to repair and regenerate. HMGB1 seems a promising molecule for periodontal regeneration in the future. Overall, what we have learned so far from our own study as well as others about HMGB1 is that it is released from damaged cells or cells under stress. Once extracellularly, HMGB1, in turn, affect cells behaviors including proliferation and migration. These abilities might be beneficial for tissue repair and regeneration. However, since extracellular HMGB1 also acted as a proinflammatory cytokine (3,6), over expression might led to inflammatory reaction and destruction of the tissue itself. Thorough understanding of HMGB1 molecular mechanism is an essential key before this molecule could be successfully utilized in clinical situation in the future.

Bibliography

1. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. Goodwin GH et al. Eur J Biochem. 1973;38:14-19
2. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. Ulloa L, Messmer D. Cytokine Growth Factor Rev. 2006 Jun;17(3):189-201. Epub 2006 Mar 2. Review
3. The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. Hreggvidsdottir HS, Ostberg T, Wähämaa H, Schierbeck H, Aveberger AC, Klevenvall L, Palmblad K, Ottosson L, Andersson U, Harris HE. J Leukoc Biol. 2009 Sep;86(3):655-62. Epub 2009 Jun 29.
4. HMGB1 is a potent trigger of arthritis, Andersson U, Erlandsson-Harris H. J Intern Med. 2004 Mar;255(3):344-50.
5. Chromatin and cell death. Bianchi ME, Manfredi A. Biochim Biophys Acta. 2004 Mar 15;1677(1-3):181-6. Review.
6. The cytokine activity of HMGB1--extracellular escape of the nuclear protein. Sun NK, Chao CC. Chang Gung Med J. 2005 Oct;28(10):673-82.
7. HMGB1 loves company. Bianchi ME. J Leukoc Biol. 2009 Sep;86(3):573-6. Epub 2009 May 4. Review.
8. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson

J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. Science. 1999 Jul 9;285(5425):248-51.

9. The cytokine activity of HMGB1. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. J Leukoc Biol. 2005 Jul;78(1):1-8. Epub 2005 Feb 25. Review.
10. Bench to bedside: HMGB1-a novel proinflammatory cytokine and potential therapeutic target for septic patients in the emergency department. Sama AE, D'Amore J, Ward MF, Chen G, Wang H. Acad Emerg Med. 2004 Aug;11(8):867-73. Review.
11. HMGb1 promotes scratch wound closure of HaCaT keratinocytes via ERK1/2 activation. Ranzato E, Patrone M, Pedrazzi M, Burlando B. Mol Cell Biochem. 2009 Dec;332(1-2):199-205. Epub 2009 Jul 9.
12. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME. J Cell Biol. 2004 Feb 2;164(3):441-9.
13. Decreased expression of the high-mobility group protein T160 by antisense RNA impairs the growth of mouse fibroblasts. Hertel L, Foresta P, Barbiero G, Ying GG, Bonelli G, Baccino FM, Landolfo S, Gariglio M. Biochimie. 1997 Dec;79(12):717-23.
14. High mobility group box 1 protein inhibits the proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes their migration and differentiation along osteoblastic pathway. Meng E, Guo Z, Wang H, Jin J, Wang J, Wang H, Wu C, Wang L. Stem Cells Dev. 2008 Aug;17(4):805-13.
15. High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing. Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, De

Mori R, Guerra L, Maurelli R, Panacchia L, Di Giacomo F, Palumbo R, Di Campli C, Uccioli L, Biglioli P, Bianchi ME, Capogrossi MC, Germani A. J Invest Dermatol. 2008 Jun;128(6):1545-53.

16. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. J Leukoc Biol. 2007 Jan;81(1):59-66.
17. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Müller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, Bianchi ME.J Cell Biol. 2001 Mar 19;152(6):1197-206.
18. Regulation of cell migration by amphoterin. Fages C, Nolo R, Huttunen HJ, Eskelinen E, Rauvala H. J Cell Sci. 2000 Feb;113 (Pt 4):611-20.
19. Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepäntalo M, Carpén O, Parkkinen J, Rauvala H. Blood. 2004 Aug 15;104(4):1174-82. Epub 2004 May 6.
20. Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. Palumbo R, Galvez BG, Pusterla T, De Marchis F, Cossu G, Marcu KB, Bianchi ME. J Cell Biol. 2007 Oct 8;179(1):33-40.
21. High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. Pisetsky DS, Erlandsson-Harris H, Andersson U. Arthritis Res Ther. 2008;10(3):209. Epub 2008 Jun 30. Review.

22. Bone grafts in periodontal therapy. Sukumar S, Drízhal I. Acta Medica (Hradec Kralove). 2008;51(4):203-7. Review

23. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. J Dent Res. 1988 Jan;67(1):66-70.

Glossary

HMGB1	เอชเอ็มจีบี1
Periodontium	อวัยวะปริทันต์
Periodontal disease	โรคปริทันต์
Proliferation	การเพิ่มจำนวน
Migration	การเคลื่อนที่
Human gingival fibroblast	เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์
Human periodontal ligament fibroblast	เซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์
Stimulation	การกระตุ้น
Inhibition	การยับยั้ง
Control group	กลุ่มควบคุม

VITAE

1. **Name** : Mrs.Nirada Dhanesuan

   Office : Department of Stomatology

   Faculty of Dentistry

   Srinakarinwirot University

   Tel- 02-664-1000 Ext 5126

   Educational background:

   Ph.D. in Oral biology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. , 2002

   D.D.S., Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 1993

2. **Name** : Mr Narongsak Laosrisin

   Office : Department of Conservative and Prosthodontic Dentistry

   Faculty of Dentistry

   Srinakarinwirot University

   Tel- 02-664-1000 Ext 5111

   Educational background:

   Ph.D. in Dental Science, Tokyo medical and Dental University, Japan , 1996

   Cert in Periodontology, Tokyo medical and Dental University, Japan, 1989

   Cert in Japanese language, Osaka University of Foreign Studies, Japan, 1986

   D.D.S., Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 1985

3. **Name** : Miss Rungtiwa Punpa

Office : Department of Conservative and Prosthodontic Dentistry

Faculty of Dentistry

Srinakarinwirot University

Tel- 02-664-1000 Ext 5112

Educational background:

Master degree in Periodontology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

D.D.S., Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand,

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ

ผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อการเพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

HMGB1 effect on proliferation and migration of gingival and periodontal ligament fibroblasts

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาถึงผลของโปรตีนเอชเอ็มจีบี1 ต่อการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์

ที่มาของการวิจัย

เอชเอ็มจีบี1 (High molecular group box protein1 : HMGB1) เป็นโปรตีนซึ่งได้รับการค้นพบครั้งแรกเมื่อประมาณ 30 ปีที่แล้ว โดยพบเป็นโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียส และมีบทบาทต่อการแสดงออกของดีเอ็นเอ (1) ในการศึกษาระยะต่อมาพบว่าเอชเอ็มจีบี1 ไม่ได้จำกัดหรือมีบทบาทเฉพาะภายในเซลล์ แต่สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ และถูกหลั่งออกจากเซลล์ได้โดยเซลล์หลายชนิด เอชเอ็มจีบี1 ถูกหลั่งออกมาอย่างช้า ๆ (passively secreted) จากเซลล์ที่ถูกทำลายหรือเกิดการตายแบบนีโครซิส (necrosis) และหลั่งออกมาอย่างรวดเร็วจากแมคโครฟาจ (macrophage) และโมโนไซท์ (monocyte) ซึ่งการหลั่งของเอชเอ็มจีบี 1 นี้ส่งผลกระตุ้นปฏิกิริยาการอักเสบให้เกิดตามมา (2) ได้มีการศึกษาหลายงานที่แสดงถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี1 ในโรคและสภาวะที่เกี่ยวพันกับการอักเสบ รวมถึงโรคไขข้ออักเสบ (arthritis), ปอดอักเสบ (pneumonia) และภาวะสารพิษในเลือด (endotoxemia) (2,3) อย่างไรก็ตามนอกไปจากบทบาทในด้านการกระตุ้นการอักเสบแล้ว ยังพบบทบาทด้านอื่น ๆ ของเอชเอ็มจีบี1 กล่าวคือ เอชเอ็มจีบี1 สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ (migration) ของเซลล์หลายชนิด รวมถึงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหนู, เดนดริติกเซลล์ (dendritic cell), โมโนไซท์, เซลล์สร้างเส้นใย (5-9) และกระตุ้นการเจริญของเซลล์ mesoangioblast (10) ซึ่งผลการศึกษาเหล่านี้แสดงถึงบทบาทในด้านบวกของเอชเอ็มจีบี1 ต่อการช่วยในการหายของแผลได้ (wound healing) กล่าวโดยสรุปก็คือ เอชเอ็มจีบี1 มีบทบาทเป็นไซโตไคน์อักเสบที่ก่อให้เกิดการบาดเจ็บ การอักเสบของเนื้อเยื่อ และกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางระบบได้ในหลายลักษณะ ทั้งในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง

โรคปริทันต์เป็นโรคในช่องปากที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ โรคปริทันต์นั้นมีเชื้อโรคเป็นสาเหตุเริ่มต้น ก่อให้เกิดสภาวะเหงือกอักเสบ (gingivitis) แต่การลุกลามไปสู่การเป็นโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) นั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ที่สำคัญได้แก่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคลต่อสิ่งกระตุ้นด้วย การเกิดการอักเสบของอวัยวะปริทันต์นี้จะตามมาด้วยการเกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน นำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด การรักษาที่ทำอยู่ในปัจจุบันคือการกำจัดเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุโดยการขูดหินน้ำลาย เกลารากฟัน โดยอาจร่วมด้วยการให้ยาปฏิชีวนะในบางกรณี

การศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มผู้วิจัย พบว่าเอชเอ็มจีบี1สามารถสร้างได้จากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก เอ็นยึดปริทันต์ และโพรงประสาทฟัน การกระตุ้นเซลล์เหล่านี้ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Escheritia coli* (E.coli) และเชื้อ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) ส่งผลเพิ่มการสร้างเอ็ชเอ็มจีบี1มากขึ้น (ทุนรายได้มหาวิทยาลัยปี 2548 รอบ 2 และทุนรายได้มหาวิทยาลัยปี 2550) การศึกษาในครั้งนี้จะศึกษาถึงผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ องค์ความรู้ที่ได้จะช่วยให้มองเห็นภาพโดยรวมของเอชเอ็มจีบี1 ต่อเซลล์ของอวัยวะปริทันต์มากขึ้น อันจะนำไปเป็นแนวทางเพื่อการพัฒนาการรักษาโรคปริทันต์ต่อไปในอนาคต

1. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids.Goodwin GH et al. Eur J Biochem. 1973;38:14-19
2. HMGB1 is a potent trigger of arthritis, Andersson U, Erlandsson-Harris H. J Intern Med. 2004 Mar;255(3):344-50.
3. The cytokine activity of HMGB1--extracellular escape of the nuclear protein. Sun NK, Chao CC. Chang Gung Med J. 2005 Oct;28(10):673-82.
4. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Müller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, Bianchi ME.J Cell Biol. 2001 Mar 19;152(6):1197-206.
5. High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing. Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, De Mori R, Guerra L, Maurelli R, Panacchia L, Di Giacomo F, Palumbo R, Di Campli C, Uccioli L, Biglioli P, Bianchi ME, Capogrossi MC, Germani A. J Invest Dermatol. 2008 Jun;128(6):1545-53.
6. Regulation of cell migration by amphoterin. Fages C, Nolo R, Huttunen HJ, Eskelinen E, Rauvala H. J Cell Sci. 2000 Feb;113 (Pt 4):611-20.

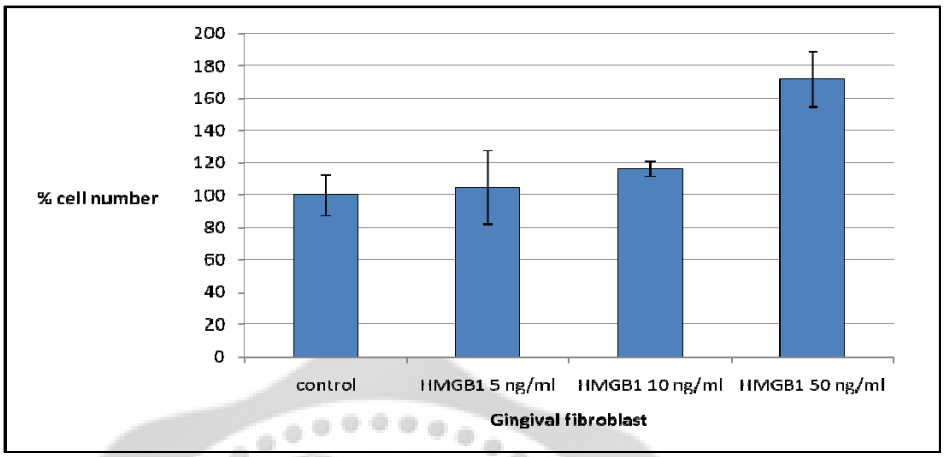
7. Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. Palumbo R, Galvez BG, Pusterla T, De Marchis F, Cossu G, Marcu KB, Bianchi ME. J Cell Biol. 2007 Oct 8;179(1):33-40.
8. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. J Leukoc Biol. 2007 Jan;81(1):59-66.
9. Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepäntalo M, Carpén O, Parkkinen J, Rauvala H. Blood. 2004 Aug 15;104(4):1174-82.
10. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME. J Cell Biol. 2004 Feb 2;164(3):441-9.
11. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtländer T, Ferrier P, Ferrari S, Bianchi ME. Nat Genet. 1999 Jul;22(3):276-80.
12. Expression of HMGB1 during tooth development. Sugars R, Karlström E, Christersson C, Olsson ML, Wendel M, Fried K. Cell Tissue Res. 2007 Mar;327(3):511-9.
13. Human gingival fibroblasts release high-mobility group box-1 protein through active and passive pathways. Feghali K, Iwasaki K, Tanaka K, Komaki M, Machigashira M, Ishikawa I, Izumi Y. Oral Microbiol Immunol. 2009 Aug;24(4):292-8.

การดำเนินงานและผลงานที่ได้รับจากการวิจัย (โดยสังเขป) พร้อมภาพประกอบ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ในห้องปฏิบัติการจากผู้ป่วยที่มารับการถอนฟันที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มศว จำนวน 3 ราย โดยได้รับความยินยอม และงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะอนุกรรมการพิจารณาจริยธรรมในงานวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ในส่วนแรกเป็นการศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีโปรตีนเอชเอ็มจีบี1 (จากบริษัท Sigma) ในขนาด 5, 10 และ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เป็นเวลา 6 วัน และวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที ส่วนที่สองเป็นการวัดการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้วิธีทรานส์เวลล์ ใช้เอชเอ็มจีบี1 ในขนาด 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ผลที่พบว่าเอชเอ็มจีบี1 ในขนาด 50 นาโน

กรัมต่อไมโครลิตรส่งผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก แต่ไม่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ ดังแสดงในรูปที่ 1 สำหรับการเคลื่อนที่ของเซลล์ พบว่าเอชเอ็มจีบี1 ในขนาด 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่งผลกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2

1A



1B

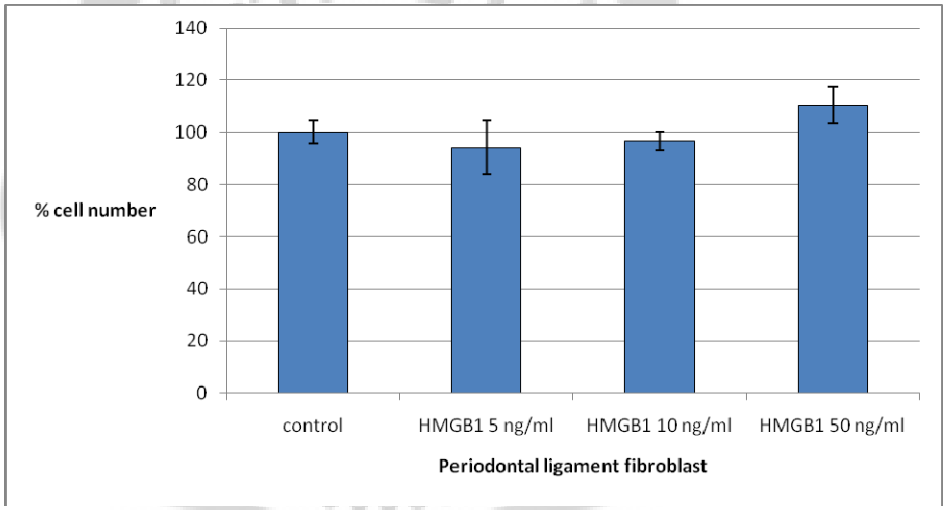
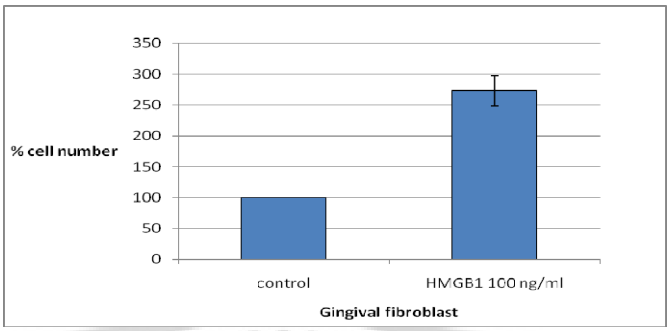


Figure 1 Proliferation assay by MTT analysis in HGF (1A.) and HPDLF (1B.)
Cells (3,000 per well) were plated overnight in a 96-well-plate. The next day, conditioned media were changed to SF-DMEM (100 ul/well). HMGB1 was treated to the cells at concentrations of 5, 10 and 50 ng/ml. Sterile distilled water was used as a control. After 6 days, cultured media were discarded and MTT assay was performed. (* means statistically significant at p-value < 0.05)

2A

Negative control HMGB1 100 ng/ml

2B



2C

Negative control HMGB1 100 ng/ml

2D

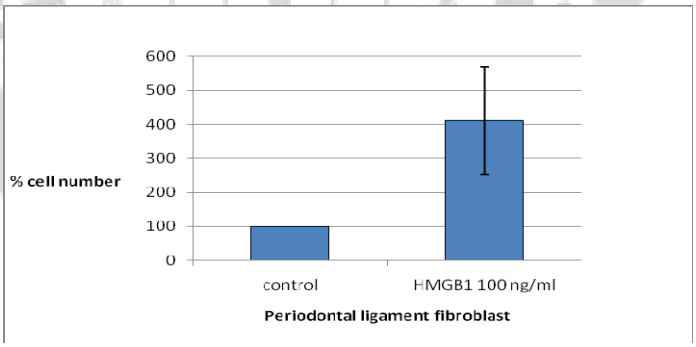


Figure 2 Migration assay by transwell method for HGF (2B.) and HPDLF (2D.)
Cells (120,000) were plated into the upper chamber of 6.5 mm transwell (8 um in pore size). Five hundred ul of chemoattractant (100 ng/ml of HMGB1) dissolved in 1%FCS-DMEM was put in the lower chamber. Sterile distilled water in 1%FCS-DMEM was used as a negative control and fibroblast conditioned medium was used as a positive control (data not shown). After 16 hours, cells on the upper side were wiped off and cells on the lower chamber fixed by methanol and stained with 0.1% crystal violet. 2A and 2D were example of the stained membrane under 40x magnification power of inverted microscope for HGF and HPDLF respectively.

การนำผลงานวิจัยไปประยุกต์ใช้

ความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นองค์ความรู้พื้นฐาน แสดงให้เห็นว่าเอชเอ็มจีบี1 ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก และเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อปริทันต์ ในอนาคตหากมีความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเอชเอ็มจีบี1 เพิ่มมากขึ้น อาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อปริทันต์ในคลินิกได้

ผลงานวิจัย/ผลผลิต สิ่งประดิษฐ์ นวัตกรรม หรืออื่น ๆ ที่ได้จากการทำวิจัย และมี Impact ต่อสังคม, ประเทศชาติได้รับประโยชน์อะไร

โรคปริทันต์เป็นโรคในช่องปากที่พบได้มากในประชากรที่มีอายุสูงขึ้น เป็นผลให้เกิดการสูญเสียฟันไปในที่สุด การประยุกต์ใช้ในอนาคตจะนำไปสู่การบูรณะเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

ปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นจากการทำวิจัย

-

ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

-

งานวิจัยที่คาดว่าจะดำเนินการต่อไป

- การศึกษาถึงผลของเอชเอ็มจีบี1 ต่อเซลล์กระดูกเบ้าฟัน ซึ่งเป็นหนึ่งในอวัยวะปริทันต์ ความรู้ที่ได้จะช่วยเติมเต็มความเข้าใจถึงบทบาทของเอชเอ็มจีบี1 ต่ออวัยวะปริทันต์ยิ่งขึ้น
- การศึกษาถึง pathway ภายในเซลล์ที่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวน หรือการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1

คณะผู้ทำวิจัย

1. ชื่อสกุล ผศ.ทพญ.ดร.นิรดา ธเนศวร **หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน**

สังกัด คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่ตั้ง 114 สุขุมวิท 24 เขตวัฒนา กรุงเทพ 10110
โทรศัพท์ที่ทำงาน02-6641000 ต่อ 5126 โทรสาร 02-6641882
อีเมลล์ nirada@swu.ac.th

2. ชื่อสกุล รศ.ทพ.ดร.ณรงศักดิ์ เหล่าศรีสิน

สังกัด คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่ตั้ง 114 สุขุมวิท 24 เขตวัฒนา กรุงเทพ 10110
โทรศัพท์ที่ทำงาน02-6641000 ต่อ 5111 โทรสาร 02-6641882

3. **ชื่อสกุล** อ.ทพญ.รุ่งทิวา ปันป่า
สังกัด คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่ตั้ง 114 สุขุมวิท 24 เขตวัฒนา กรุงเทพ 10110
โทรศัพท์ที่ทำงาน02-6641000 ต่อ 5112 โทรสาร 02-6641882

ทุนสนับสนุน

ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปีงบประมาณ 2553
เริ่มงานวิจัย ปี 2553
สิ้นสุดงานวิจัย ปี 2554