

เอสโตรเจนเสริมฤทธิ์ของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตาและทีเอ็นเอฟ-อัลฟา ในการกระตุ้นการแสดงออกของเมทริกซ์เมแทโลโปรทีเนส-1 และไนตริกออกไซด์ซินเทส-3 ในเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ของมนุษย์*

ทัศนีย์ ยงชัยตระกูล**, ประสิทธิ์ ภาสพันธุ์**

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการทดลองนี้ ต้องการศึกษาคำตอบสนองของเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ของมนุษย์ เมื่อกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา หรือ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา เพียงลำพัง หรือในภาวะที่มีเอสโตรเจนร่วมด้วย โดยวิเคราะห์การแสดงออกของเมทริกซ์เมแทโลโปรทีเนส-1 และไนตริกออกไซด์ซินเทส-3 หลังการกระตุ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วยเวสเทอร์นบลอต และอาร์ที-พีซีอาร์ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าเอสโตรเจนโดยลำพังไม่มีผลต่อการแสดงออกของเมทริกซ์เมแทโลโปรทีเนส-1 และไนตริกออกไซด์ซินเทส-3 ในขณะที่อินเตอร์ลิวคิน-1 เบตาและทีเอ็นเอฟ-อัลฟา มีผลในการเพิ่มระดับการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสองชนิด และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา หรือทีเอ็นเอฟ-อัลฟา ในภาวะที่มีเอสโตรเจนร่วมด้วย พบว่าเอสโตรเจนสามารถเสริมฤทธิ์ของอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา ในการเพิ่มระดับของเมทริกซ์เมแทโลโปรทีเนส-1 และ ไนตริกออกไซด์ซินเทส-3 จาก 1.3 และ 4.2 เท่าเมื่อกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-1 โดยลำพัง เป็น 2.3 และ 5 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในทำนองเดียวกัน ในภาวะที่มีเอสโตรเจนร่วมกับ ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา ระดับการแสดงออกของ เมทริกซ์เมแทโลโปรทีเนส-1 และ ไนตริกออกไซด์ซินเทส-3 จะเพิ่มจาก 2.2 และ 1.8 เท่า เมื่อกระตุ้นด้วยทีเอ็นเอฟ-อัลฟา โดยลำพัง เป็น 3.2 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงว่า ระดับของเอสโตรเจนที่เพิ่มขึ้นสามารถเสริมฤทธิ์ของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งอาจมีผลในการเพิ่มการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์

บทนำ

โรคปริทันต์เป็นโรคที่เกิดจากการทำลายอย่างเรื้อรังของเนื้อเยื่อปริทันต์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียฟันในที่สุด กลไกหลักที่ก่อให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อนั้น พบว่าเกิดจากการตอบสนองของเซลล์ในเนื้อเยื่อปริทันต์ต่อผลผลิตของแบคทีเรียในช่องลึกปริทันต์ โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต โดยผลผลิตจากแบคทีเรียเหล่านั้นจะกระตุ้นให้เซลล์หลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ที่เหนี่ยวนำ

กระบวนการอักเสบ¹ รวมทั้งเอนไซม์ออกมาเป็นจำนวนมาก²⁻³ ซึ่งนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์

ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา (interleukin-1 β ; IL-1 β) และทูเมอร์ เนโครซิส แฟกเตอร์ อัลฟา (Tumor necrosis factor-alpha; TNF- α) จะมีอิทธิพลเหนี่ยวนำให้เซลล์เพิ่มการสร้างและหลั่งไซโตไคน์ตัวอื่น ๆ⁴⁻⁵ รวมทั้งกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase, NOS)⁶ ทำให้มีระดับของไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; NO) เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมีผลต่อการทำลาย

* แหล่งเงินทุน: เงินวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.อังรีตุนังต์ ปทุมวัน กทม. 10330

ของเนื้อเยื่อ⁷ นอกจากนี้ ไซโตไคน์ยังกระตุ้นการสร้างและหลั่งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (matrix metalloproteinase; MMP)⁸⁻⁹ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ ความสัมพันธ์ของไซโตไคน์และเอนไซม์ดังกล่าว มีผลในการเพิ่มความรุนแรงของการทำลายเนื้อเยื่อ

สำหรับโรคปริทันต์อักเสบ ความรุนแรงของการอักเสบนอกจากจะขึ้นกับแบคทีเรีย ไซโตไคน์ และเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นแล้ว ระดับของฮอโมนหลายชนิดในร่างกาย รวมทั้งฮอโมนเพศ จะมีอิทธิพลต่อระดับของความรุนแรงของการอักเสบและการทำลายของเนื้อเยื่อ โดยมีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับของฮอโมนเพศ โดยเฉพาะเอสโตรเจน (estrogen) และโปรเจสเตอโรน (progesterone) ทั้งในกรณีของหญิงมีครรภ์ ผู้ที่ได้รับยาคุมกำเนิด หญิงในวัยหมดประจำเดือน หรือในวัยรุ่น จะพบการเพิ่มขึ้นของคราบจุลินทรีย์ (bacterial plaque) และไซโตไคน์ ที่เหนี่ยวนำการอักเสบ รวมทั้งมีอัตราของการเกิดโรคเหงือกอักเสบและโรคปริทันต์เพิ่มมากขึ้น¹⁰⁻¹¹ ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความสัมพันธ์ ระหว่างระดับของฮอโมนเพศกับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคปริทันต์¹²

แม้จะมีหลักฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเอสโตรเจนกับอัตราของการเกิดโรคเหงือกและปริทันต์อักเสบ ผลการศึกษาถึงบทบาทของเอสโตรเจน ต่อการหลั่งไซโตไคน์เกี่ยวข้องกับการอักเสบในห้องปฏิบัติการยังคงไม่ชัดเจน เนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดจะตอบสนองต่อฮอโมนตัวนี้แตกต่างกันอย่างมาก ตัวอย่างเช่น เอสโตรเจนสามารถเพิ่มการหลั่งของอินเตอร์เฟอรอนแกมมา (interferon-gamma) ในเซลล์เม็ดเลือดขาว¹³ รวมทั้งเพิ่มการหลั่งของไนตริกออกไซด์ซินเทสในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนู¹⁴ และเซลล์กระดูก (osteoblast) ของคน¹⁵ แต่ในทางตรงกันข้าม ก็มีรายงานว่า เอสโตรเจนมีอิทธิพลในการลดการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์แมโครเฟจ (macrophage)¹⁶ รวมทั้งยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ซินเทสในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดและไมโครเกลีย (microglia) ของหนู¹⁷ ซึ่งผลที่ขัดแย้งนี้ ทำให้บทบาทของเอสโตรเจนต่อกระบวนการอักเสบยังคงไม่ชัดเจน

ในกรณีของโรคปริทันต์อักเสบ การศึกษาถึงผลของเอสโตรเจนในกระบวนการอักเสบ ในแง่ที่สัมพันธ์กับไซโตไคน์ ยังมีน้อยมาก ทำให้ความเข้าใจถึงความเสี่ยงของการเกิดโรคปริทันต์ในภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงของเอสโตรเจนยังไม่ชัดเจน การศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้ จะช่วยเพิ่มความ

เข้าใจในกระบวนการเกิดโรคปริทันต์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการรักษาโรคต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ ศึกษาผลของเอสโตรเจนที่มีต่อพฤติกรรมของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยิดปริทันต์ ในแง่ของการแสดงออกของเอ็นโดทีเลียมไนตริกออกไซด์ซินเทส (endothelial NOS; NOS-3) และการหลั่งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (MMP-1) โดยเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์ในภาวะที่มีเอสโตรเจนโดยลำพัง กับในภาวะที่มีไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (IL-1 β หรือ TNF- α) ร่วมกับเอสโตรเจน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเอ็นยิดปริทันต์

เซลล์จากเนื้อเยื่อเอ็นยิดปริทันต์ ซึ่งต่อไปจะเรียกว่าเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ จะเตรียมจากเนื้อเยื่อบริเวณรากฟันปกรามซี่ที่ 3 ของผู้ป่วยที่มาถอนฟันกรามซี่สุดท้ายที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยฟันซี่นั้นๆ ถูกล้างทำความสะอาดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เชลยอน ที่ปราศจากเชื้อหลายครั้ง จากนั้นจึงใช้มีดผ่าตัดขูดเนื้อเยื่อออกจากผิวฟันบริเวณตอนกลางของรากฟัน (middle third) เพื่อหลีกเลี่ยงเนื้อเยื่อเหงือกและเนื้อเยื่อจากปลายรากฟัน เนื้อเยื่อที่ได้จะถูกนำไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GibcoBRL, NY, USA) ที่ประกอบด้วยซีรัมวัวระยะ 10 (10% fetal calf serum) กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM Glutamine) เพนนิซิลลิน 100 ยูนิต/มิลลิลิตร (100 IU/ml penicillin) สเตรปโตมัยซินซัลเฟต 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (100 mg/ml streptomycin sulfate) และแอมโฟเทอริซินบี 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (0.25 mg/ml amphotericin B)

ชิ้นเนื้อจะถูกเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์เริ่มคลานออกจากชิ้นเนื้อ หลังจากที่ได้เซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ ก็จะมีการขยายจำนวนเซลล์โดยการถ่าย (subculture) ลงจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ในอัตราส่วน 1:3 โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-

EDTA, GibcoBRL, NY, USA) และเริ่มนับเซลล์ที่ถ่ายใหม่เป็นเซลล์รุ่นที่ 1 จากนั้นเซลล์จะถูกถ่ายสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในแต่ละการทดลองต่อไปนี้จะใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วยอย่างน้อย 3 คน โดยใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-4

การกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol, IL-1 β และ TNF- α

เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีความหนาแน่น 25,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์ถูกเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแลกตัลบูมิน (Lactalbumin) ร้อยละ 0.2 และไม่มีซีรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol (17 β -estradiol, Sigma, St. Louis, MO, USA), IL-1 β (rat, recombinant expressed in E. coli) หรือ TNF- α (Sigma, St. Louis, MO, USA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน และเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับการทดสอบความเป็นพิษ หรือ 48 ชั่วโมงสำหรับการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ NOS-3 และ MMP-1 ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR) และการหลั่ง MMP-1 โดยวิธีเวสเทอร์นบลอต

ในการทดลองขั้นต่อไป เป็นการกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol ร่วมกับ IL-1 β หรือ estradiol ร่วมกับ TNF- α โดยใช้ความเข้มข้นที่ให้ผลการตอบสนองชัดเจนที่สุดจากการทดลองข้างต้น (estradiol 100 ไมโครโมลาร์, IL-1 β 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ TNF- α 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) และศึกษาการแสดงออกของ NOS-3 และ MMP-1 และการหลั่ง MMP-1 ในเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธีเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น

การวัดความเป็นพิษด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

ความเป็นพิษของสารที่ใช้ในการทดสอบ คือ estradiol, IL-1 β และ TNF- α ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะวัดโดย MTT assay ตามวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว¹⁸ โดยเซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 25,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในวันรุ่งขึ้นอาหารเลี้ยงเซลล์ถูกเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย สารที่ใช้ในการทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใน 4 ชั่วโมงสุดท้ายของการกระตุ้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มีฟีนอลเรด (phenol red) และมี MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่ความเข้มข้น

สุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติม DMSO (dimethylsulfoxide) 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึกฟอร์มาแซน (formazan) ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลาย MTT จากนั้นจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นจะแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นจำนวนเซลล์ตามกราฟมาตรฐาน และปรับเป็นจำนวนร้อยละของเซลล์

การวิเคราะห์ปริมาณ MMP-1 ด้วยวิธีเวสเทอร์นบลอตและออโตฟลูออโรกราฟี (auto-fluorography)

อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยการนำไปปั่นด้วยนาโนเซป (Nanosep) ที่สามารถแยกโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตันออกไปได้ โดยปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10-15 เท่า แล้วนำไปแยกด้วยไฟฟ้าในอคริลไมด์เจล (acrylamide gel) และเคลื่อนย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) ด้วยไฟฟ้า

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้ ไปย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ MMP-1 (primary rabbit anti-human MMP-1, affinity isolated antibody developed against N-terminal, Sigma, St. Louis, MO, USA) ต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (Biotin conjugated mouse monoclonal anti-rabbit IgG, clone RG-16, Sigma) และย้อมด้วย streptavidin conjugated with peroxidase (Zymed, South San Francisco, CA, USA) สัญญาณของ MMP-1 จะถูกตรวจสอบด้วยวิธีออโตฟลูออโรกราฟี โดยการเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้วด้วยชุดขยายสัญญาณแบบเคมี (Renaissance[®] Chemiluminescence, NENTM Life Science, USA) จากนั้นจึงตรวจจับสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ (CL-XposureTM Film, Pierce, Rockford, IL, USA)

การวิเคราะห์ระดับของอาร์เอ็นเออาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์

อาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์จะถูกสกัดด้วย TRIzol (Gibco, NY, USA) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต อาร์เอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปผ่านกระบวนการรีเวอร์สทรานสคริปชัน (reverse

transcription) ด้วยเอนไซม์ AMV (Avian myeloblastosis virus) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) และ oligodT primer (Promega, Madison, WI, USA) เพื่อสังเคราะห์คอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ (cDNA) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

cDNA ที่ได้จะถูกนำไปเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้เครื่อง ThermoHybaid (Ashford, UK) การเพิ่มจำนวนจะทำได้โดยใช้สายไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อ NOS-3, MMP-1 และ GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) ควบคุมกันไป เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (internal control) ของการทดลอง ไพรเมอร์ต่อ human NOS-3, MMP-1 และ GAPDH ถูกออกแบบจากลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank ลำดับของนิวคลีโอไทด์ ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 อุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 ครั้ง ตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 45 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบสำหรับ NOS-3 และ MMP-1 และ 25 รอบสำหรับ GAPDH และที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที อีก 1 รอบ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว สายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้นของอกาโรสร้อยละ 2 และถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพลารอยด์ (polaroid) บนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet)

ผล

การทดสอบความเป็นพิษของ estradiol, IL-1 β และ TNF- α ที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์

รูปที่ 1 แสดงถึงผลของสารในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ต่อจำนวนเซลล์ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า estradiol ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อจำนวนเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 1,000 ไมโครโมลาร์ แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ (one way ANOVA, $p < 0.05$) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ estradiol ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ในการทดลองขั้นต่อไป

สำหรับ IL-1 β และ TNF- α พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1, 1

และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ของสารทั้งสองชนิด ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลต่อการแสดงออกและการหลั่งเอนไซม์ MMP-1

เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นสารทั้งสามชนิดคือ estradiol, IL-1 β และ TNF- α ถูกนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของอาร์เอ็นเอ นำรหัสด้วยอาร์ที-พีซีอาร์ ในขณะเดียวกัน ก็นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ MMP-1 ด้วยเวสเทอร์นบลอต ผลการทดลองในรูปที่ 2 แสดงว่า การกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ (คือ 1, 10, 100 ไมโครโมลาร์) ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงของ MMP-1 ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่การกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-1 β และ TNF- α สามารถกระตุ้นการแสดงออกและการหลั่ง MMP-1 ได้ชัดเจนที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โปรตีน MMP-1 ที่ปรากฏเป็น 2 แถบ (doublet) เป็นแถบของ proMMP-1 ซึ่งมีรายงานว่าสามารถพบแถบคู่ได้ในเซลล์สร้างเส้นใย¹⁰ การแสดงออกของ MMP-1 ได้เปรียบเทียบกับ GAPDH ที่เท่ากัน สำหรับระดับของ MMP-1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ได้เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน

การแสดงออกของ NOS-3

รูปที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ NOS-3 จากการกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β และ TNF- α โดยใช้เทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ พบว่า estradiol ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ NOS-3 ในขณะที่ทั้ง IL-1 β และ TNF- α สามารถกระตุ้น NOS-3 การแสดงออกของ GAPDH เป็นกลุ่มควบคุมภายใน

การเปลี่ยนแปลงของ MMP-1 และ NOS-3 ในภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย estradiol ร่วมกับ IL-1 β หรือ TNF- α

รูปที่ 4 แสดงผลการกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol ร่วมกับ IL-1 β (10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) วิเคราะห์ระดับอาร์เอ็นเอ นำรหัสของ NOS-3 และระดับของ MMP-1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยตรวจสอบความเข้มของ PCR product และแถบสีของโปรตีน ด้วยการอ่านค่าความเข้มจากเครื่องอ่านความเข้ม (Imaging densitometer GS-700, BioRad, Hercules, CA, USA) และแสดงค่าเปรียบเทียบเป็นกราฟแท่ง ผลการทดลองแสดงว่า มีการเสริมฤทธิ์ระหว่าง estradiol กับ IL-1 β ในการเพิ่มการหลั่ง

MMP-1 โดยพบว่า การกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol เองไม่มีผลในการกระตุ้นการหลั่ง MMP-1 ในขณะที่ IL-1 β สามารถเพิ่มการหลั่ง MMP-1 เป็น 1.3 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และในภาวะที่กระตุ้นด้วย estradiol ร่วมกับ IL-1 β ระดับของการหลั่ง MMP-1 เพิ่มขึ้นเป็น 2.3 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูป 4A) ในทำนองเดียวกัน เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของ NOS-3 ผลปรากฏว่า estradiol ซึ่งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ NOS-3 สามารถเสริมผลของ IL-1 β ในการเพิ่ม NOS-3 ให้ชัดเจนขึ้นจาก 4.2 เท่าเป็น 5 เท่า (รูป 4B)

รูปที่ 5 แสดงผลการเสริมฤทธิ์ของ estradiol ต่อ TNF- α โดยพบว่าแม้ estradiol เองไม่กระตุ้นการเพิ่ม MMP-1 แต่สามารถเพิ่มการหลั่ง MMP-1 เมื่อใช้ร่วมกับ TNF- α โดยเสริมฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่ง MMP-1 ของ TNF- α จาก 2.2 เท่า เป็น 3.2 เท่า (รูป 5A) และเพิ่มการกระตุ้นการแสดงออกของ NOS-3 จาก 1.8 เท่าเป็น 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูป 5B)

การทดลองทั้งหมดจะทำซ้ำสามโดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากเนื้อเยื่อเอ็นดอทีลียัลของผู้ป่วยสามคน

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในอาร์ที-พีซีอาร์

Table 1 Sequence of oligonucleotide primers for RT-PCR

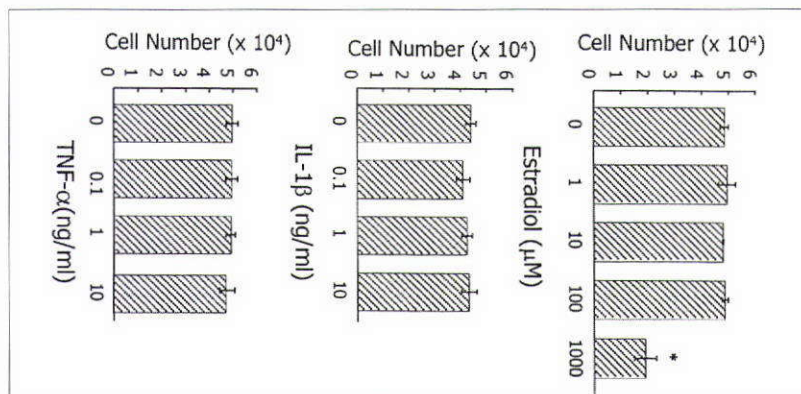
Primer	Sequence	Location	End-product	reference
NOS-3	sense 5' CTACAATCCGCTCAGTGGA 3'	2302-2322		
	antisense 5' CCGAGCTGACTGAGTAGTAC 3'	2834-2853	552 bp	GI: 10835160 ²⁹
MMP-1	sense 5' CATCCAAGCCATATATGGAGGTTCC 3'	833-687		
	antisense 5' TCTGGAGAGTCAAAATCTCTTCGT 3'	1419-1443	611 bp	GI: 13027798 ³⁰
GAPDH	sense 5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT 3'	71-91		
	antisense 5' TCACACCCATGACGAACATGG 3'	446-466	396 bp	GI: 4503912 ³¹

NOS-3; Nitric oxide synthase-3

MMP-1; Matrix Metalloproteinase-1

GAPDH; Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase

Bp; base pair

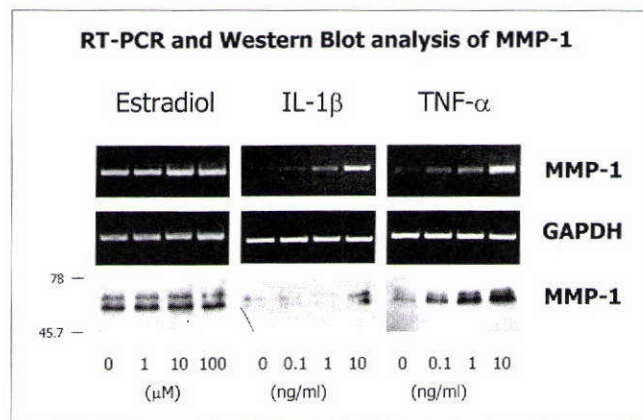


รูปที่ 1 การทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี MTT

กราฟแสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ TNF- α ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบด้วย one way ANOVA)

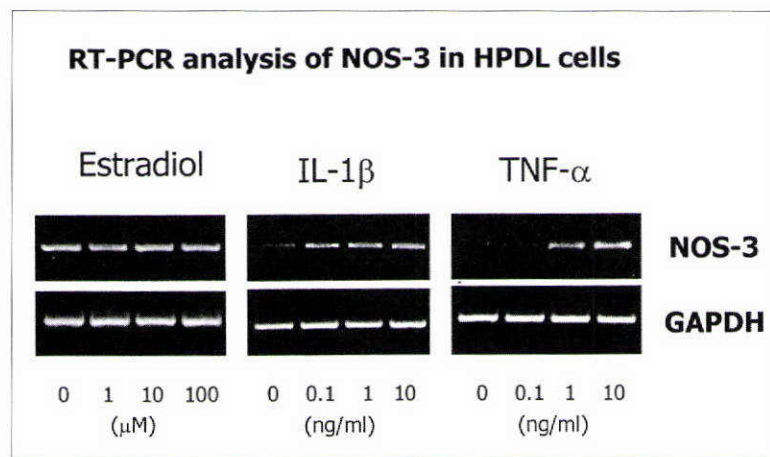
Fig. 1 The toxicity test of the materials used by MTT assay

Graphs showed the cell number after being treated with various concentrations of estradiol, IL-1 β or TNF- α for 24 hour. (* denoted a significant difference ($p < 0.05$) tested by one way ANOVA).



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงระดับของอาร์เอ็นเอเข้ารหัส และปริมาณของ MMP-1 ในเซลล์เอ็นดอปรีทินต์ของมนุษย์ ที่ถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ TNF- α เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ TNF- α ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัสและเอนไซม์ MMP-1 ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ และเวสเทิร์นบลอตตามลำดับ

Fig. 2 The altered levels of mRNA and the amount of MMP-1 in human periodontal ligament (HPDL) cells treated with estradiol, IL-1 β or TNF- α . Cells were treated with various concentrations of estradiol, IL-1 β or TNF- α for 48 hours. The levels of mRNA and the amount of MMP-1 were analyzed by RT-PCR and western analysis, respectively.



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของ NOS-3 ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ TNF- α เซลล์เอ็นดอปรีทินต์ถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ TNF- α ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงสกัด RNA นำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ NOS-3 ด้วย RT-PCR โดยใช้ระดับของ GAPDH เป็นตัวควบคุมภายใน

Fig. 3 The change of NOS-3 in the cells treated with estradiol, IL-1 β หรือ TNF- α . HPDL cells were treated with estradiol, IL-1 β หรือ TNF- α at various concentrations. The RNA was extracted and analyzed by RT-PCR. GAPDH was an internal control.

คน²⁷ หรือบทบาทของรีเซพเตอร์ในการเสริมการทำงานของโปรโมเตอร์ (IL-1 β promoter) ในเซลล์แมโครเฟจ²⁸ การศึกษาเพิ่มเติมถึงการทำงานร่วมกันระหว่างเอสโตรเจนรีเซพเตอร์และทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (proinflammatory transcription factor) ชนิดต่างๆ ในเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์ น่าจะเป็นอีกคำตอบหนึ่งที่จะช่วยให้เรามีความเข้าใจกลไกการเกิดโรคและการป้องกันการทำลาย หรือลดระดับความรุนแรงของการทำลายเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น

บทสรุป

เซลล์เอ็นดอทีลียัลสามารถตอบสนองต่อการเพิ่มขึ้นของระดับเอสโตรเจนในห้องปฏิบัติการ ในลักษณะที่ช่วยเสริมฤทธิ์การทำงานของไซโตไคน์ที่เกี่ยวกับการอักเสบ โดยที่ IL-1 β และ TNF- α มีผลในการเพิ่มระดับของ MMP-1 และ NOS-3 ที่น่าสนใจคือ แม้เอสโตรเจนโดยลำพังไม่มีผลในการกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสองชนิด แต่ระดับของเอสโตรเจนที่เพิ่มขึ้นสามารถเสริมฤทธิ์ของ IL-1 β และ TNF- α ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งอาจมีผลในการเพิ่มการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ท.ญ. สิริลักษณ์ ติรณธนากุล ในการช่วยดูแลเซลล์เพาะเลี้ยงเอ็นดอทีลียัล ขอขอบคุณอาจารย์และบุคลากรภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปากและกายวิภาคศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านเนื้อเยื่อและสถานที่สำหรับงานวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod* 1999;25:795-9.
- DeCarlo AA Jr, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and noval processing of matrix metalloproteinases by a thiolproteinase from the oral anaerobe Porphyromonas gingivalis. *J Dent Res* 1997;76:1260-70.
- Bartista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis* 2002;8(5):254-60.
- Bartold PM, Haynes DR. Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodontol Res* 1991;26:339-45.
- Takigawa M, Takashiba S, Takahashi K, Arai H, Kurihara H, Murayama Y. Prostaglandin E₂ inhibits interleukin-6 release but not its transcription in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1b or tumor necrosis factor- α . *J Periodontol* 1994;65:1122-7.
- Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *J Periodontol* 2002;73:392-400.
- Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis* 2001;7(1):2-10.
- Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000 1997;14:112-43.
- Nakaya H, Oates TW, Hoang AM, Kamoi K, Cochran DL. Effects of interleukin-1 beta on matrix metalloproteinase-3 levels in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 1997;68:517-23.
- Hugoson A. Gingival inflammation and female sex hormones. *J Periodontol Res* (suppl) 1970;5:1-18.
- Mombelli A, Gusberti FA, Van Oosten MAC, Lang NP. Gingival health and gingivitis development during puberty: a 4-year longitudinal study. *J Clin Periodontol* 1989;16:451-6.
- Sooriyamoorthy M, Gower DB. Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *J*

- Clin Periodontol* 1989;16:201-8.
13. Fox HS, Bond BL, Parslow TG. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J Immunol* 1991;146:4362-7.
 14. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Vetter H. Expression of oestrogen receptor a and b in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol* 1998;156:1-7.
 15. Armour KE, Ralston SH. Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblastic-like cells. *Endocrinology* 1998;139:799-802.
 16. Deshpande R, Khalili H, Pergolizzi RG, Michael SD, Chang MD. Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:46-54.
 17. Vegeto E, Pollio G, Ciana P, Maggi A. Estrogen blocks inducible nitric oxide synthase accumulation in LPS-activated microglia cells. *Exp Gerontol* 2000;35:1309-16.
 18. Charoonpatrapong K, Pattamapun K. Comparison of two methods in measuring the cytotoxicity effects: Methylene blue assay and MTT assay. *CU Dent J* 2000;23:83-90.
 19. Strongin GP, Bauer EA, Jeffrey JJ, Eisen AZ. Human skin collagenase: isolation of precursor and active forms from both fibroblast and organ cultures. *Biochem* 1977;16:1607-15.
 20. Morishita M, Shimazu A, Iwamoto Y. Analysis of oestrogen receptor mRNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 1999;44:781-3.
 21. Kawasaki T, Ushiyama T, Inoue K, Hukuda S. Effects of estrogen on interleukin-6 production in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:743-5.
 22. Guerne PA, Carson DA, Lotz M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J Immunol* 1990;144:499-505.
 23. Akoum A, Lawson C, McColl S, Villeneuve M. Ectopic endometrial cells express high concentrations of interleukin (IL)-8 in vivo regardless of the menstrual cycle phase and respond to oestradiol by up-regulating IL-1-induced IL-8 expression in vitro. *Mol Hum Reprod* 2001;7:859-66.
 24. Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij LF, Faas MM. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: increasing sensitivity of human monocytes to endotoxin. *Fertil Steril* 2001;76:555-9.
 25. Liao EY, Luo XH. Effects of 17beta-estradiol on the expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human osteoblast-like cell cultures. *Endocrine* 2001;15:291-5.
 26. Guo Z, Krucken J, Benten WP, Wunderlich F. Estradiol-induced nongenomic calcium signaling regulates genotropic signaling in macrophages. *J Biol Chem* 2002;277:7044-50.
 27. Harnish DC, Scicchitano MS, Adelman SJ, Lyttle CR, Karathanasis SK. The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells. *Endocrinology* 2000;141:3403-11.
 28. Ruh MF, Bi Y, D'Alonzo R, Bellone CJ. Effect on estrogens on IL-1beta promoter activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;66:203-10.
 29. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992;267:14519-22.
 30. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem* 1986;261:6600-5.
 31. Hanauer A, Mandel JL. The glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase gene family: structure of a human cDNA and of an X chromosome linked pseudogene; amazing complexity of the gene family in mouse. *EMBO J* 1984;13:2627-33.

Original Article

Estrogen enhances the effect of IL-1 β and TNF- α on MMP-1 secretion and NOS-3 expression in human PDL cells.*

Tussanee Yongchaitrakul**, Prasit Pavasant**

Abstract

The purpose of this study is to investigate the responses of human periodontal ligament (HPDL) cells after activating with IL-1 β or TNF- α alone or activating with the combination of estrogen. After 48 hours of activation, the levels of MMP-1 in the medium and NOS-3 expression were examined using western analysis and RT-PCR, respectively. The results indicated that estrogen alone had no effect on MMP-1 and NOS-3, while IL-1 β and TNF- α increased both secretion of MMP-1 and expression of NOS-3. Interestingly, when cells were activated with estrogen and IL-1 β simultaneously, the level of MMP-1 and NOS-3 increased up to 2.3 and 5 folds, respectively, compared with 1.3 and 4.2 folds when cells received IL-1 β alone. Similarly, activation with estrogen and TNF- α increased the level of MMP-1 and NOS-3 from 2.2 and 1.8.folds up to 3.2 and 2.5.folds, respectively, in comparing with TNF- α treated alone. The results showed that increasing level of estrogen could enhance the effect of pro-inflammatory factors, which consequently enhanced periodontal tissue destruction.

Key words : estrogen, IL-1, MMP-1, NOS, periodontal ligament cells, TNF

* Grant support; Ratchadaphisek Somphot Endowment, Chulalongkorn University.

** Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Henri Dunant Road, Pathumwan, Bangkok 10330