ผลของเอชเอ็มจีบี1และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสต่อการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์

ประพัฒน์ ประเดิมดุษฎีพร* ดวงพร ศรีสุภาพ นิรดา ธเนศวร*** ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน******

บทคัดย่อ

เอชเอ็มจีบี1 ถูกพบครั้งแรกเป็นโปรตีนในนิวเคลียส ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของดีเอ็นเอ เมื่อถูกหลั่งออกภายนอกเซลล์จะทำหน้าที่เสมือนไซโตไคน์ ถูกพบในน้ำเหลืองเหงือกและเนื้อเยื่อปริทันต์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ มีการแสดงออกของยีนและการหลั่งเอชเอ็มจีบี 1 หลังกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของเอชเอ็มจีบี 1 ต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ โดยศึกษาผลการกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ในการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ด้วยเอชเอ็มจีบี 1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เปรียบเทียบกับกระตุ้นด้วย เอชเอ็มจีบี1 หรือไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสเพียงอย่างเดียว โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดจากเนื้อเยื่อของฟันที่ไม่แสดงรอยโรคของการอักเสบจากผู้ป่วย 2 ราย กระตุ้นเซลล์ทั้งสองชนิดด้วยเอชเอ็มจีบี 1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส หรือเอชเอ็มจีบี 1 หรือไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส โดยมีสภาวะไม่ได้กระตุ้นเป็นกลุ่มควบคุมลบ ภายหลังการกระตุ้น 48 ชั่วโมงนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรวจหาปริมาณเอ็มเอ็มพี-1 ด้วยวิธีอีไลซา และตรวจสอบการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีเรียลไทม์ รีเวอร์สทรานสคริปเทส-พีซีอาร์ที่ 4 ชั่วโมง วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของความเข้มข้นเอ็มเอ็มพี-1 ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวและเปรียบเทียบรายคู่ด้วยสถิติแบบทีและวิเคราะห์การแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอด้วยสถิติเชิงพรรณา จากการทดลองพบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดมีการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้งสองชนิดร่วมกันมากกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มีการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสหรือกระตุ้นด้วยสารอย่างใดอย่างหนึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุม การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยเอชเอ็มจีบี 1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสสามารถเพิ่มการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 48 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น

คำสำคัญ : เอชเอ็มจีบี1 โรคปริทันต์อักเสบ เซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกมนุษย์ เซลล์สร้างเส้นใยของเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ เอ็มเอ็มพี-1

**นิสิตหลังปริญญา ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110*

***อาจารย์ ***ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110*

*****รองศาสตราจารย์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110*

The Effect of Combination of HMGB1 and Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide on MMP-1 Releasing from Human Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts

Prapat Pradermdutsadeeporn* Duangporn Srisuparbh Nirada Dhanesuan*****
Narongsak Laosrisin****

Abstract

Background: HMGB1 is first characterized as a nuclear protein, regulating DNA transcription. The extracellular HMGB1 functions like a cytokine. It has been found in gingival crevicular fluid and periodontium of periodontitis patients. The gene expression and secretion of HMGB1 have been detected in gingival and periodontal ligament (PDL) fibroblasts by activated with lipopolysaccharide of Porphyromaonas gingivalis. In order to confirm the role of HMGB1 in periodontal destruction, the effect of combined HMGB1 and LPS of P. gingivalis activation on matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) secretion from human gingival and periodontal fibroblasts were determined.

Material and Methods: Human gingival and PDL fibroblasts were derived from explants obtained from 2 healthy individuals with non-inflamed periodontal supporting tissue. Both cells were co-cultured with combination of HMGB1 and LPS of P. gingivalis, HMGB1 or LPS alone, as well as no any stimulant as a control. After 48 hours, MMP-1 level in supernatants was measured by ELISA. Four hours after activation, MMP-1 mRNA expression was investigated by Realtime RT-PCR . MMP-1 levels were compared between groups by using One-way analysis of variance (One-way ANOVA) and T test whereas mRNA expressions were analyzed descriptively.

Results: Both cells secreted greater MMP-1 levels in combined stimulants group than control, HMGB1 and LPS group ($P<0.01$). Clearly mRNA expression of MMP-1 was higher in only PDL fibroblasts after HMGB1, LPS and combined activation than those in control group.

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

Keywords : High mobility group box 1, Periodontitis, Human gingival fibroblasts, Human periodontal ligament fibroblasts, Matrix metalloproteinase-1

**Postgraduate student, Department of Conservative Dentistry and Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok, 10110 Thailand.*

***Lecturer, ***Assistant Professor, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok, 10110 Thailand.*

*****Associate Professor, Department of Conservative Dentistry and Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok, 10110 Thailand.*

บทนำ

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคติดเชื้อในช่องปาก มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในรูปแบบการหลั่งไซโตไคน์และเอนไซม์ ทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ นำไปสู่การสูญเสียฟันในช่องปาก ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ที่สำคัญได้แก่ ทูเมอร์ เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor α) อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (Interleukin-1β) อินเตอร์ลิวคิน-6 (Interleukin-6) ส่วนเอ็นไซม์ที่สำคัญคือ เอ็มเอ็มพี-1 (MMP-1) ซึ่งทราบกันแล้วว่าสารต่างๆเหล่านี้หลั่งจากเซลล์ที่เกี่ยวข้องต่อระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ นิวโทรฟิล (Neutrophil) โมโนไซต์ (monocyte) แมกโครฟาจ (Macrophage) แต่ก็มีหลักฐานที่แสดงว่าสามารถหลั่งจากเซลล์ในช่องปากได้ด้วย [1-6]

เอชเอ็มจีบี1 เป็นโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียส ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี 1973 [7] มีขนาดหน่วยอะมิโน 215 ยูนิต โครงสร้างแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนจับของดีเอ็นเอ (DNA binding domain) ได้แก่ เอชเอ็มจี บอกซ์ เอ (HMG box A) เอชเอ็มจี บอกซ์ บี (HMG box B) และส่วนปลายด้านซี (C-terminal) ที่มีฤทธิ์เป็นกรด (Acidic tail) เอชเอ็มจีบี1 ถูกพบครั้งแรกมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของดีเอ็นเอ คงสภาพนิวคลิโอโซม (Nucleosomes) และควบคุมแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (Gene transcription) การศึกษาต่อมาพบเอชเอ็มจีบี1 ภายนอกเซลล์ [8] โดยพบเซลล์ที่สามารถหลั่งเอชเอ็มจีบี1 ได้แก่ โมโนไซต์ แมกโครฟาจ เด็นไดรติกเซลล์ (Dendritic cell) นิวโทรฟิล เซลล์บุผิว (Epithelial cell) เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (Endothelial cell) และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ [9] (Smooth muscle cell) เอชเอ็มจีบี1 มีส่วนเกี่ยวข้องต่อโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ เช่น รูมาตอยด์ [10,11] เบาหวาน โรคติดเชื้อในปอด [12] (Pneumonia) และพบเอชเอ็มจีบี1 ภายหลังกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ของหนูด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ แต่เมื่อฉีดแอนตีเอชเอ็มจีบี1 เข้าในหนูทดลองจะช่วยลดอัตราการเสียชีวิตของหนูทดลองได้ [13] และเมื่อกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยของผู้ป่วยโรครูมาตอยด์และโรคข้อเข่าเสื่อม (Osteoarthritis) ด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์หรืออินเตอร์ลิวคิน 1 เบต้า พบมีการหลั่งไซโตไคน์และเอ็มเอ็มพี-3 ออกมามากขึ้น [14]

ในทางทันตแพทยศาสตร์สามารถตรวจพบเอชเอ็มจีบี1 ในเซลล์ของอวัยวะปริทันต์หรือในน้ำเหลืองเหงือก (Gingival crevicular fluid) ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบได้เช่นกัน [15] จากการศึกษาของกนิษฐ์และคณะในปี 2006 [16] พบการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ เมื่อกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้ออีโคไล (Escherichia coli) ต่อมาในปี 2008 รุ่งทิวาและคณะ [17] พบการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอและโปรตีนเมื่อกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส

จากงานวิจัยที่ผ่านมาทำให้เกิดข้อสงสัยในความเกี่ยวข้องของเอชเอ็มจีบี1 ต่อกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ โดยสงสัยว่า เอชเอ็มจีบี1 ที่ถูกหลั่งออกมาอาจทำหน้าที่เป็นไซโตไคน์และกระตุ้นให้เกิดการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ในการกระตุ้นให้เกิดการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ซึ่งจะสามารถช่วยอธิบายกลไกการเกิดพยาธิสภาพ รวมถึงพัฒนาวิธีการรักษาโรคปริทันต์อักเสบต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาถึงการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 และการแสดงออกในระดับแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์จากการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เทียบกับสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้นหรือกระตุ้นด้วยสารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการทำวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒแล้ว ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์จากเนื้อเยื่อปริทันต์ของฟันที่ไม่แสดงรอยโรคของการอักเสบจากผู้ป่วย 2 รายที่ได้รับการถอนฟันเพื่อการจัดฟันหรือผ่าฟันคุด นำฟันมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายน์ (Phosphate Buffer Saline) จนปราศจากเลือด ทำการตัดชิ้นเหงือกที่ติดฟันเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยใบมีดผ่าตัดปราศจากเชื้อเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก และทำการขูดผิวรากฟันส่วนกลางเพื่อนำเนื้อเยื่อเอ็นปริทันต์มาเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ นำเนื้อเยื่อทั้งสองมาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ (Dulbecco Modified Eagle's Medium) ที่เติมซีรัมจากฟีตัสของวัวร้อยละ 10 (10% Fetal calf serum) กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM L-Glutamine) เพนนิซิลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (100 units/ml Pennicillin) และสเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (100 µg/ml Streptomycin) เลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออก ไซด์ร้อยละ 5 เซลล์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นเซลล์รุ่นที่ 3-8

การเตรียมเอชเอ็มจีบี1 และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส

เตรียมเอชเอ็มจีบี1 จากรีคอมบิแนนท์ เอชเอ็มจีบี1 (SIGMA-ALDRISH, St Louis, MO, USA) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำปราศจากเชื้อ (Sterile dH_2O) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำ มาใช้ในการทดลอง

เตรียมไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาวิส (InvivoGen, California, USA) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำปราศจากเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

การกระตุ้นเซลล์

ถ่ายเซลล์ลงในจานเลี้ยงแบบ 6 หลุม ให้มีความหนาแน่น 200,000 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 10 ปล่อยให้เซลล์มายึดที่จานเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมร้อยละ 1 เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง กระตุ้นเซลล์ทั้ง 2 ชนิดด้วย 4 สภาวะคือ 1) น้ำปราศจากเชื้อ 2) ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 3) เอชเอ็มจีบี1 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 4) เอชเอ็มจีบี1 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การวัดปริมาณเอ็มเอ็มพี-1 ด้วยวิธีอีไลซา

ในการวิเคราะห์การหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 จากเซลล์สร้างเส้นใยทั้งสองชนิดทำหลังจากกระตุ้นเซลล์แล้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมงภายใต้การทำซ้ำ 2 ครั้ง ดูดสารละลายเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกระตุ้นแล้ว มาวิเคราะห์ด้วยใช้ชุดทดสอบอีไลซาสำเร็จรูป (DuoSets ELISA Kit, R&D System INC, Minneapolis, USA) โดยแต่ละตัวอย่างนำมาทำซ้ำ 3 ครั้งตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต วัดการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของเอ็มเอ็มพี-1

การวิเคราะห์การแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ

ทำการสกัดแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ที่ผ่านการกระตุ้นแล้ว 4 ชั่วโมงด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (PureLink RNA minikit, Life Techno logies, NY, USA) ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต้นแบบ (Complementary DNA) จากแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอด้วยชุดสังเคราะห์สำเร็จรูป (RevertAid^{TM} first strand cDNA synthesis kit: Fermentas, Life sciences, Maryland, USA) ตามคำแนะนำจากบริษัทผู้ผลิต วิเคราะห์การแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอเอ็มเอ็มพี-1 ด้วยวิธีเรียลไทม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส-พีซีอาร์ (Realtime RT-PCR) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้มีลำดับเบสดังตารางที่ 1

ตารางที่1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์เอ็มเอ็มพี-1 และแกปดีเอช

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาด (bp)
MMP-1[18]	Forward: 5'CACAGCTTTCCTCC ACTGCTGCTGC 3' Reverse: 5'GGCATGGTCCACA TCTGCTCTTGGC 3'	396
GAPDH[19]	Forward: 5'ATCCCATCACCATC TTCCAG 3' Reverse: 5'CCATCACGCCACAG TTTCC 3'	383

ปฏิกิริยาเรียลไทม์ รีเวอร์สทรานสคริปเทส-พีซีอาร์ดำเนินโดยใช้ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร สารละลายเรียลไทม์พีซีอาร์สำเร็จรูป (Lightcycler 480 SYBR Green I Master system, Roache, Indianapolis, USA) 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์สายละ 0.5 ไมโครลิตร ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ประกอบด้วย initial denaturation 95 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที, denaturation 95 องศาเซลเซียสนาน 10 วินาที, annealing 58 องศาเซลเซียสนาน 15 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียสนาน 25 วินาทีและสุดท้ายด้วย final extension 72 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ในแต่ละกลุ่มด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปเอสพีเอสเอส 20.0 (SPSS 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) โดยตรวจสอบความปกติในการแจกแจงข้อมูล (Normality test) และทำการวิเคราะห์ผลความเข้มข้นของเอ็มเอ็มพี-1 ด้วยการวิเคราะห์การแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ที่นัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$ วิเคราะห์ผลการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอด้วยสถิติเชิงพรรณา

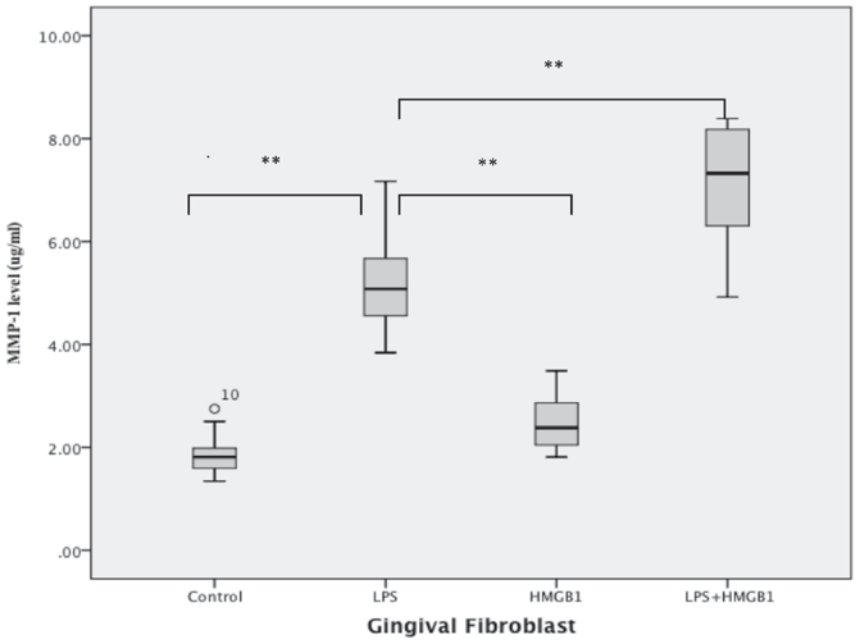
ผลการทดลอง

การหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมีการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ในกลุ่มควบคุมลบปริมาณ 1.85 ± 0.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 จะมีการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ปริมาณ 7.26 ± 0.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่มที่ได้รับ การกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 จะมีการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ปริมาณ 2.46 ± 0.13ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสจะมีการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ปริมาณ 5.16 ± 0.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารสองชนิดร่วมกันกับทุกกลุ่มที่ศึกษาเช่นเดียวกับกลุ่มถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ที่แตกต่างจากกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ดังแสดงในรูปที่ 1

การหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ในเซลล์สร้างเส้นใยของเอ็นยึดปริทันต์

เซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มีการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ในกลุ่มควบคุมลบปริมาณ 1.79 ± 0.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิสร่วมกับเอชเอ็มจีบี1 มีการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1ปริมาณ 6.9 ± 1.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1จะมีการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1ปริมาณ1.28 ± 0.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส จะมีการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 ปริมาณ 4.9 ± 0.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.01) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารสองชนิดร่วมกันกับทุกกลุ่มที่ศึกษา เช่นเดียวกับกลุ่มถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ที่แตกต่างจากกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.01) เช่นเดียวกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1 แสดงปริมาณการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 หลังกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส 48 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้นหรือกระตุ้นเพียงอย่างเดียว

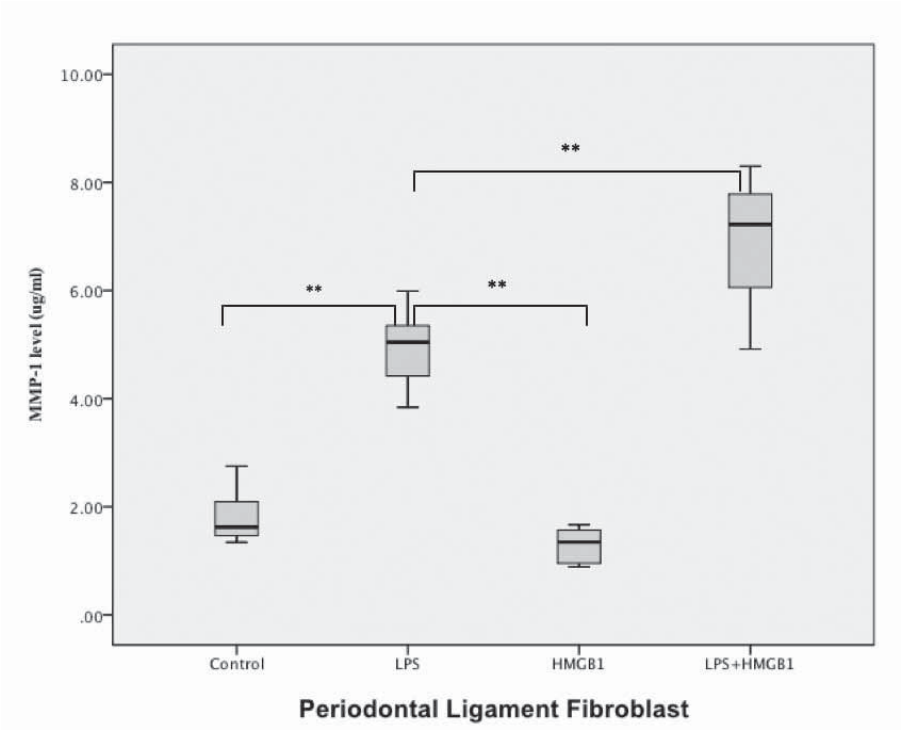
***** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p<0.01***

Control = ***กลุ่มควบคุมลบ***

LPS = ***กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรค์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส***

HMGB1 = ***กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1***

LPS+HMGB1 = ***กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน***



รูปที่ 2 แสดงปริมาณการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 หลังกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส 48 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้นหรือกระตุ้นเพียงอย่างเดียว

***** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p<0.01***

Control = ***กลุ่มควบคุมลบ***

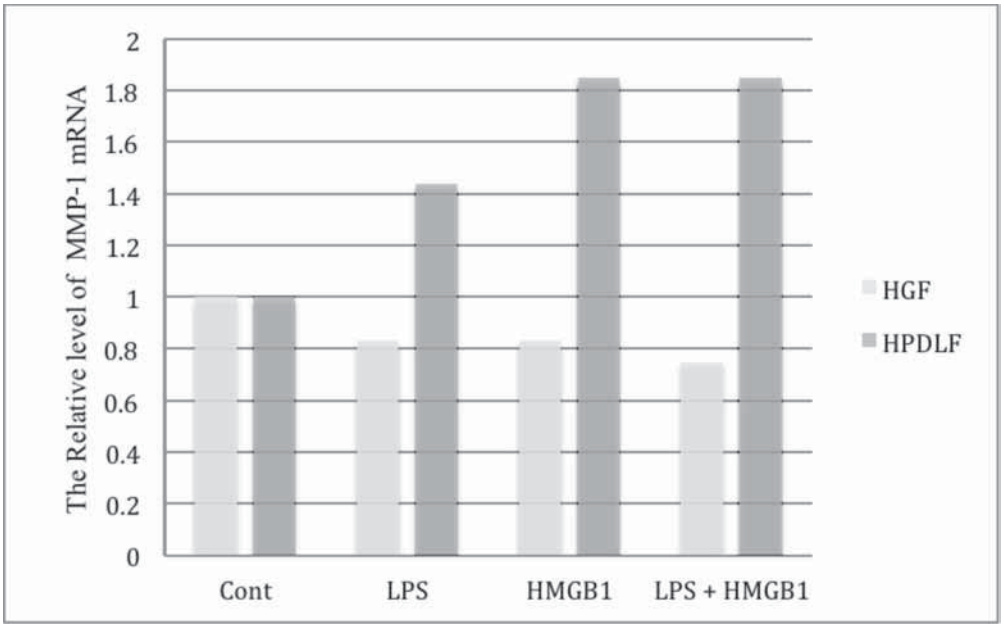
LPS = ***กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส***

HMGB1 = ***กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1***

LPS+HMGB1 = ***กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน***

การแสดงออกในระดับแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอของเอ็มเอ็มพี-1ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์

จากการทดลองพบว่าในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมีการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอโดยเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส พบว่ามีการลดการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอเป็น 0.83 เท่า เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 พบว่ามีการลดการแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอเป็น 0.83 เท่า และเมื่อได้รับการกระตุ้นร่วมกัน พบว่ามีการลดการแสดงออกของแมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอเป็น 0.75 เท่า ส่วนเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส พบว่ามีการเพิ่มการแสดงออกของแมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอเป็น 1.44 เท่าและเมื่อได้รับการกระตุ้นร่วมกันหรือกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 เพียงอย่างเดียว พบว่ามีเพิ่มการแสดงออกของแมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอเป็น 1.85 เท่า ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงผลการแสดงออกของแมสเซนเจอร์ อาร์เอ็นเอของเอ็มเอ็มพี-1ในเซลล์แต่ละชนิดที่ 4 ชั่วโมง ภายหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นต่างๆ

Control = ***กลุ่มควบคุมลบ***

LPS = ***กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส***

HMGB1 = ***กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1***

LPS+HMGB1 = ***กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน***

บทวิจารณ์

เอชเอ็มจีบี1 เป็นนิวเคลียสโปรตีน แต่สามารถหลั่งออกมาภายนอกเซลล์และมีความเชื่อว่าเอชเอ็มจีบี1 จะทำหน้าที่เสมือนเป็นไซโตไคน์ได้ โดยไปมีส่วนร่วมในขบวนการของการเกิดการอักเสบหรือการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายได้ เช่น พบมีการหลั่งสารทูเมอร์ เนคโครซิส แฟกเตอร์ แอลฟา ภายหลังทำการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 [19] เป็นต้น อย่างไรก็ดี การศึกษาในระยะหลังยังพบอีกว่าปริมาณสารไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาภายหลังกระตุ้นเซลล์ต่างๆ ด้วยเอชเอ็มจีบี1 ดูเหมือนจะมีปริมาณที่น้อยมาก [21] อีกทั้งยังตรวจพบว่ามีปริมาณเอชเอ็มจีบี1 จำนวนมากถึง 176 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในของเหลวจากการล้างปอดผู้ป่วยโรคติดเชื้อในปอดที่ได้รับการรักษาแล้ว ในขณะที่ตรวจพบปริมาณเอชเอ็มจีบี1 17.8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในของเหลวจากการล้างปอดของกลุ่มที่มีสุขภาพแข็งแรง [22] จึงทำให้เห็นว่า บทบาทของของเอชเอ็มจีบี1 ในการเป็นไซโตไคน์ยังไม่เด่นชัดนัก

ในทางทันตแพทยศาสตร์ ได้มีการวิจัยเกี่ยวกับบทบาทและความสำคัญของเอชเอ็มจีบี1 อยู่บ้างโดยเฉพาะ อย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบ การวิจัยส่วนใหญ่มุ่งที่จะศึกษาในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ เนื่องจากเซลล์ทั้งสองชนิดนี้เป็นเซลล์ที่พบมากที่สุดในอวัยวะปริทันต์ ซึ่งมีหน้าที่หลักในการสร้างเส้นใยคอลลาเจนอันเป็นองค์ประกอบหลักของอวัยวะปริทันต์ นอกจากนี้เซลล์สร้างเส้นใยเหล่านี้ยังสามารถหลั่งไซโตไคน์หรือเอ็นไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันได้ด้วย [1-3] ซึ่งเซลล์สามารถตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค เช่น พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส โดยมีการหลั่งสารพวกทูเมอร์ เนคโครซิส แฟกเตอร์ อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า อินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8

และเอ็มเอ็มพี-1ได้ [4,5] จึงทำให้เชื่อได้ว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์จะเป็นเซลล์ที่สำคัญในขบวนการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ [6]

จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยจะมีการหลั่งเอชเอ็มจีบี1 เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส หรือเมื่อเกิดมีการตายของเซลล์ในเนื้อเยื่อไม่ว่าจะในรูปแบบเนคโครซิส (necrosis) หรือแบบอะพอพโตซิส (apoptosis) ก็ตาม [23] จึงเป็นที่น่าสงสัยว่าเอชเอ็มจีบี1 ที่ถูกหลั่งออกมานั้นจะมีผลอย่างไรต่อเซลล์ที่อยู่ในบริเวณรอยโรคนั้นๆ อีก และทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ให้รุนแรงขึ้นด้วยหรือไม่ เนื่องจากมีการวิจัยที่ผ่านมาพบอีกว่าเอชเอ็มจีบี1 จะทำหน้าที่เสมือนเป็นไซโตไคน์ได้ดีในการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ [19] ต่อเมื่อมีการทำงานร่วมกับสารประกอบอื่น เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรีย อินเตอร์ลิวคิน1 เบต้า หรือแม้แต่ดีเอ็นเอสายเดี่ยว [24] ดังนั้นในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลของการใช้เอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส ซึ่งเป็นปัจจัยก่อโรคที่มีความรุนแรงที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง ในการกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ให้เกิดการหลั่งเอ็นไซม์เอ็มเอ็มพี-1 โดยเปรียบเทียบกับสภาวะที่ใช้การกระตุ้นด้วยสารอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการวัดปริมาณเอ็มไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ภายหลังการกระตุ้นเซลล์ที่เวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง โดยมีผลการวิจัยนำร่องที่แสดงการตรวจวัดที่ได้ผลดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการวัดภายหลังการกระตุ้นเซลล์ที่เวลาผ่านไปเพียง 24 ชั่วโมง

เอ็มเอ็มพี-1 เป็นเอ็มไซม์ที่มีศักยภาพสูงในการทำลายเนื้อเยื่อและเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ โดยสามารถพบมีการสร้างและหลั่งออกจากเซลล์บ้างอยู่แล้วในสภาวะปกติ [25,26] ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยครั้งนี้ โดยพบมีการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 เพียงเล็กน้อยในกลุ่มควบคุมลบที่ไม่ได้กระตุ้นเซลล์ด้วยสารใดๆ เลย รวมถึงการที่พบว่ามีการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 สูงขึ้นเพียงเล็กน้อยในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 เพียงอย่างเดียวด้วย ในขณะที่พบมีการหลั่งของเอ็มเอ็มพี-1 ที่สูงมากขึ้นเมื่อกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยทั้งสองชนิดด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส เพียงอย่างเดียว และสูงมากขึ้นกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อกระตุ้นด้วยสารทั้งสองอย่างร่วมกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wahamaa และคณะในปี 2011 ซึ่งพบปริมาณเอ็มเอ็มพี-3 มากขึ้นเมื่อกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ร่วมกับอินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า ผลการวิจัยนี้น่าจะเป็นการสนับสนุนถึงการที่มีการตรวจพบเอ็นไซม์เอ็มเอ็มพี-1 นี้ได้ในรอยโรคปริทันต์อักเสบในปริมาณที่สูงกว่าที่พบในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่ปกติ [27] และยังเป็นการสนับสนุนผลการวิจัยที่ผ่านมาที่แม้จะศึกษากับเซลล์ของร่างกายชนิดอื่นๆ ก็ทำให้เชื่อได้มากขึ้นว่าเอชเอ็มจีบี1 จะสามารถทำหน้าที่เสมือนไซโตไคน์ได้ดี แม้กับเซลล์ในช่องปาก โดยมีกลไกการทำงานที่ต้องร่วมกับสารโมเลกุลอื่น

ในการวิจัยนี้ นอกจากจะทำการวัดปริมาณ เอ็นไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ที่เซลล์หลั่งออกมาด้วยอีไลซาแล้ว ยังทำการวิเคราะห์การแสดงออกในระดับยีนที่สร้างเอ็นไซม์เอ็มเอ็มพี-1 ของเซลล์ทั้งสองนี้โดยวิธีเรียลไทม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส-พีซีอาร์อีกด้วย ซึ่งในการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอนี้ทำภายหลังการกระตุ้นเซลล์ที่เวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง เนื่องจากมีการวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษาในเซลล์โมโนไซต์พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอในเซลล์โมโนไซต์ในระดับที่สูง ภายหลังการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ที่เวลาผ่านไปแล้วเป็นเวลา 4 ชั่วโมง [10] อย่างไรก็ตาม ผลการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอในเซลล์ทั้งสองชนิดไม่ได้มีทิศทางที่เป็นไปในทิศทางดียวกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์สร้างเส้นใย นั้นมีการตอบสนองที่ต้องใช้เวลาที่แตกต่างไปจากเซลล์โมโนไซต์ โดยพบว่ามีบางการศึกษาที่พบเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มีการเพิ่มการแสดงออกของแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ อินเตอร์ลิวคิน-6

อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า ที่ 6 ชั่วโมงภายหลังการกระตุ้นด้วยแบคทีเรียพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส [5] หรืออาจเกิดจากสาเหตุบางประการ เช่น ความไวของเทคนิคเรียลไทม์ พีซีอาร์ เป็นต้น

จากผลการแสดงออกที่ไม่เป็นทิศทางเดียวกันของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ในครั้งนี้ อาจมีสาเหตุมาจากการที่เซลล์สร้างเส้นใยทั้งสองชนิดมีหน้าที่และมีคุณลักษณะธรรมชาติของเซลล์ที่แตกต่างกัน เช่น เซลล์ทั้งสองนี้มีการแสดงออกของออสติโอแคลซิน (Osteocalcin) หรือโบนไซอะโลโปรตีน (Bone sialoprotein) รวมถึงอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase) แตกต่างกัน [28] โดยเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์มีการแสดงออกของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปริมาณที่สูง [29] ทำให้สามารถผลิตสารคล้ายโปรตีนเมทริกซ์ของกระดูกและสามารถสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (mineralized nodules) ได้ดีกว่า ในขณะที่เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมีการแสดงออกของตัวรับซีดี 14 (CD14) ที่สูงกว่า จึงอาจทำให้เซลล์ทั้งสองนี้มีการแสดงออกเพื่อตอบสนองการกระตุ้นด้วยเอชเอ็มจีบี1 ได้แตกต่างกัน อนึ่งในการวิจัยนี้ใช้เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือกและจากเอ็นยึดปริทันต์จากผู้ป่วยรายเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบจะพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยเอ็นยึดปริทันต์จะมีการแสดงออกของแมสเซ็นเจอร์อาร์เอ็นเอที่ผลิตเอ็มเอ็มพี-1 ได้มากกว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก ทั้งในสภาวะปกติและเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิด ไม่ว่าจะเป็นการกระตุ้นร่วมหรือกระตุ้นเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 3)

อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้จากการค้นคว้าวิจัยในครั้งนี้ยังไม่เพียงพอที่จะสามารถสรุปได้ว่าเอชเอ็มจีบี1 เป็นโมเลกุลที่มีส่วนร่วมต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบโดยแท้จริง เนื่องจากการศึกษานี้เป็นเพียงการวิเคราะห์ปริมาณเอ็มเอ็มพี-1 ที่หลั่งออกนอกเซลล์และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ผลิตเอ็มเอ็มพี-1 ในขั้นตอนที่ถือว่าเป็นระยะทรานสคริปชันและทรานสเลชันของเอ็มเอ็มพี-1 เท่านั้น จึงยังอาจมีเรื่องของกระบวนการในการควบคุมการทำงานของเอ็มเอ็มพี-1 ที่สำคัญและควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเฉพาะกระบวนการในการกระตุ้นให้เอ็มเอ็มพี-1อยู่ในรูปพร้อมทำงาน (Activation) และกระบวนการยับยั้ง (Inhibition) การทำงานของเอ็มเอ็มพี-1 เป็นต้น

บทสรุป

การวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ด้วยเอชเอ็มจีบี1 ร่วมกับ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส จะสามารถเพิ่มการหลั่งเอ็มเอ็มพี-1 เมื่อเปรียบเทียบกับ สภาวะที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยสารใดเลย หรือกระตุ้นด้วยสารหนึ่งสารใดเพียงอย่างเดียวเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

1. 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.

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

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

4. Scheres N, Laine ML, Sipos PM, Bosch-Tijhof CJ, Crielaard W, De Vries TJ, et al. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with Porphyromonas gingivalis. J Periodont Res 2011; 46: 407–416

5. 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 2010; 45: 262–270

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

7. 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.

8. Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression. Curr Opin Genet Dev 2003; 13: 170-178.

9. Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi T, Muller S, Resnati M, Sanvito F, et al. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. J Cell Biol 2001; 152: 1197–1206.

10. Jiang W, Pisetsky DS. Mechanisms of Disease: the role of high-mobility group protein1 in the pathogenesis of inflammatory arthritis. Nat Clin Pract Rheumatol 2007; 3: 52-58.

11. Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. J Intern Med 2004; 255: 344-350

12. Ferhani N, Letuve S, Kozhich A, Thibaudeau O, Grandsaigne M, Maret M, et al. Expression of High-Mobility Group Box 1 and of Receptor for Advanced Glycation End Products in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med 2010; 181: 917-927.

13. 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.

14. Wahamaa H, Schierbeck H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Aveberger A-C, Andersson U, et al. High mobility group box protein 1 in complex with lipopolysaccharide or IL-1 promotes an increased inflammatory phenotype in synovial fibroblasts. Arthritis Research & Therapy 2011; 13: 136-148.

15. Morimoto Y, Kawahara K-I, Tancharoen S, Kikuchi K, Matsuyama T, Hashiguchi T, et al. Tumor necrosis factor-a stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1. J Periodont Res 2008; 43: 76–83.

16. Nantasenee K, Laosrisin N, Dhanesuan N. In Vitro effect of LPS on HMGB1 expression in Human Periodontal Ligament Fibroblast. Thai Pharm Health Sci J 2011; 6: 175-181.

17. รุ่งทิวา ปันป่า, ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, นิรดา ธเนศวร. การแสดงออกของเอชเอ็มจีบี1 ในเซลล์สร้างเส้นใยของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคปริทันต์. ปริญญานิพนธ์ปริทันตวิทยา. 2009

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

19. Zhang Y, Ba Y, Liu C, Sun G, Ding L, Gao S, et al. PGC-1α induces apoptosis in human epithelial ovarian cancer cells through a PPARγ-dependent pathway. Cell Research 2007; 17: 363–373.

20. 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.

21. 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.

22. Angus DC, Yang L, Kong L, Kellum JA, Delude RL, Tracey KJ, et al. Circulating high-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations are elevated in both uncomplicated pneumonia and pneumonia with severe sepsis. Crit Care Med 2007; 35: 1061-1067

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

24. Bianchi ME. HMGB1 loves company. J Leukoc Biol 2009; 86: 573-576

25. 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.

26. 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: 109–115.

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

28. Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, 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

29. Wang PL, 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.

ติดต่อบทความ:
ทันตแพทย์ ประพัฒน์ ประเดิมดุษฎีพร
นิสิตหลังปริญญา สาขาปริทันตวิทยา ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์และทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
จดหมายอิเล็กทรอนิกส์ prapat_pat@hotmail.com

Prapat Pradermdutsadeeporn
Master degree student of Master of Science Program in Periodontology, Faculty of Dentistry, SrinakharinWirot University Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok, 10110 Thailand.
E-mail: prapat_pat@hotmail.com