



การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจาก แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์

เกษรา ปัทมพันธ์¹ ท.บ., วท.ม.

ธนธร ทังทอง² ธนภูมิ ไสธยานนท์² วรภัทร หลิวจุลลจรรย์²

จินตกร คูวัฒนสุชาติ³ ท.บ., M.S.

ทัศนีย์ ดรงค์สุวรรณ¹ ท.บ., M.S.

ประสิทธิ์ ภาวนันต์¹ ท.บ., Ph.D.

¹ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²นิสิตคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ การทดลองครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของสารหลังจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ที่มีต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 จากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์

วัสดุและวิธีการ แบคทีเรียจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 5 วัน สารหลังจากแบคทีเรียทั้งที่ผ่านและไม่ได้ผ่านการต้ม ถูกนำไปกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะที่ไม่มีซีรัม ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์จะวัดด้วยเทคนิค MTT assay ส่วนการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์จะวัดโดยเทคนิค zymography ในอีกการทดลองหนึ่ง การกระตุ้นเซลล์ด้วยสารหลังจากแบคทีเรียจะทำให้ในสภาวะที่มีหรือไม่มี actinomycin D และ cycloheximide เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษา สารหลังจากแบคทีเรียในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งที่ผ่านและไม่ได้ผ่านการต้ม สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ผลของการกระตุ้นจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารหลังที่ใช้ ผลของสารหลังในการกระตุ้น MMP-2 จะถูกยับยั้งได้ด้วย cycloheximide แต่ไม่ยับยั้งด้วย actinomycin D

สรุป สารหลังจากแบคทีเรียจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 จากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์ โดยการกระตุ้นนี้ไม่ต้องการการสร้าง mRNA ใหม่แต่ต้องการการสร้างโปรตีนใหม่

(ว กบด จุฬาฯ 2544;24:1-12)

บทนำ

โรคปริทันต์ (periodontal disease) เป็นโรคที่เกิดจากการทำลายอย่างเรื้อรังของเนื้อเยื่อปริทันต์ (periodontal tissue)

ซึ่งประกอบด้วยกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) เส้นใยยึดฟัน (periodontal ligament) เคลือบรากฟัน (cementum) และส่วนของเหงือกที่ยึดเกาะกับตัวฟัน (junctional epithelium)

of gingiva)¹ สาเหตุของโรคนี้ส่วนใหญ่มาจากการสะสมของคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) บริเวณใกล้ขอบเหงือกและในร่องเหงือก (gingival sulcus) โดยปรากฏหลักฐานว่าแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของโรคปริทันต์เกิดจากแบคทีเรียกรัมลบชนิดแท่งที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต^{2,3}

กระบวนการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ นอกจากจะเกิดโดยตรงจากเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียแล้ว^{4,5} หลักฐานจากงานวิจัยในระยะหลังพบว่า การทำลายของเนื้อเยื่อส่วนใหญ่จะเป็นผลมาจากการตอบสนองของเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีต่อแบคทีเรีย⁶⁻⁸ โดยพบว่าแบคทีเรียจะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะ mononuclear cells ให้สร้างและหลั่งสาร cytokines โดยเฉพาะสารในกลุ่ม Interleukin และ Tumor necrosis factor ออกมาเป็นจำนวนมาก⁹⁻¹¹ และ cytokines เหล่านี้ จะมีผลในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์ ให้สร้างและหลั่งเอนไซม์ออกมาเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นผลให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์¹²

เอนไซม์ที่มีบทบาทในการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์คือ เอนไซม์ในกลุ่ม MMP (matrix metalloproteinase)⁷ ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนใน extracellular matrix ได้ทุกชนิดรวมทั้งสามารถย่อยเส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักของเนื้อเยื่อปริทันต์ MMP เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ต้องการอิออนของสังกะสี (zinc) ในการทำงาน ซึ่งเป็นที่มาของชื่อ metalloproteinase เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะประกอบด้วยสมาชิกมากกว่า 17 ชนิด และสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้อย่างน้อย 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เกาะอยู่ที่ผิวเซลล์ หรือ membrane type MMP (MT-MMP) และกลุ่มที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ (secreted enzyme) ซึ่งในกลุ่มหลังนี้ จะประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 กลุ่มคือ ก) interstitial collagenase (MMP-1, -8, -13) ซึ่งสามารถย่อยเส้นใยคอลลาเจน ข) gelatinase หรือ Type IV collagenase (MMP-2, -9) ซึ่งสามารถย่อย gelatin และ คอลลาเจนชนิดที่ IV และ ค) stromelysin (MMP-3, -10, -11) ซึ่งสามารถย่อยโปรตีนใน extracellular matrix ที่ไม่ใช่คอลลาเจนได้หลายชนิด¹³ หน้าที่ของเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการปรับเปลี่ยนของเนื้อเยื่อ (tissue remodelling) และกระบวนการซ่อมแซมทั้งในสภาวะปกติ และในพยาธิสภาพ โดยพบว่าการศึกษาสรีรวิทยาของการสร้างและหลั่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้ จะเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหลายชนิดด้วยกัน¹⁴

เอนไซม์ในกลุ่มของ MMP ที่มีรายงานว่าปริมาณเพิ่มมากขึ้นในโรคปริทันต์คือ เอนไซม์ MMP-1 และ MMP-8¹⁵⁻¹⁷ โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดคือ MMP-1 เป็นเอนไซม์ที่สร้างหลังจากเซลล์สร้างเส้นใยและ macrophage ในขณะที่ MMP-8 จะถูกสร้างและหลั่งจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear leukocytes⁷ โดยพบว่าระดับของเอนไซม์ทั้งสองนี้จะเพิ่มขึ้นทั้งในน้ำลายและในน้ำร่องเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์¹⁸⁻²¹

MMP-2 หรือ gelatinase A เป็นเอนไซม์อีกตัวหนึ่งซึ่งสร้างและหลั่งจากเซลล์สร้างเส้นใย รวมทั้งเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อปริทันต์^{22,23} เอนไซม์ MMP-2 เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยคอลลาเจนชนิดที่ IV ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในเบสเมมเบรน (basement membrane) ของเซลล์บุผิวและเซลล์บุผนังหลอดเลือด²⁴ และแม้ว่ากลไกการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ จะเกี่ยวข้องกับการทำลายและปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเนื้อเยื่อบุผิวและหลอดเลือดภายในอวัยวะปริทันต์ ซึ่งสัมพันธ์กับการย่อยสลายเบสเมมเบรนภายในเนื้อเยื่อปริทันต์ อย่างไรก็ตาม จากรายงานการตรวจสอบชนิดและระดับของเอนไซม์ MMP ในน้ำร่องเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์ ยังมีความไม่ชัดเจนเกี่ยวกับระดับของ MMP-2 ในน้ำร่องเหงือก^{7,25} ทำให้ความสนใจในบทบาทของเอนไซม์ตัวนี้ในโรคปริทันต์มีไม่มากนัก

อย่างไรก็ดี หลักฐานจากงานวิจัยในระยะหลัง ชี้ว่า MMP-2 น่าจะมีบทบาทในการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ โดยมีรายงานการพบเอนไซม์ MMP-2 ภายในเนื้อเยื่อปริทันต์ทั้งในระยะปกติและในสภาวะที่มีการอักเสบ รวมทั้งพบว่าระดับของ MMP-2 จะเพิ่มขึ้นภายในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์²³ กลไกการทำงานของ MMP-2 ในการทำลายเนื้อเยื่อ นอกจากจะสัมพันธ์กับการย่อยคอลลาเจนชนิดที่ IV ภายในเบสเมมเบรน แล้ว รายงานเมื่อเร็ว ๆ นี้ยังพบว่า MMP-2 สามารถย่อยสลายเส้นใยคอลลาเจนได้หลายชนิด รวมทั้งคอลลาเจนชนิดที่ I ได้เช่นเดียวกับ MMP-1 และ MMP-8 ด้วย^{13,26} นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าระดับของการทำลายของเนื้อเยื่อจะสัมพันธ์กับระดับของ MMP-2 ในรูป active form ซึ่งเป็นรูปที่พร้อมจะทำงาน มากกว่าที่จะสัมพันธ์กับระดับของ MMP-1²⁷ และเมื่อมีการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ตัวยับยั้งจำเพาะ (specific inhibitor) ต่อเอนไซม์ ยังปรากฏผลว่า MMP-2 เป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อเยื่อยึดต่อของช่องปากอีกด้วย²⁸ จากผลของรายงานและการศึกษา

ข้างต้น ทำให้เพิ่มความเป็นไปได้เกี่ยวกับบทบาทของ MMP-2 ในกระบวนการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ แต่ผลการศึกษาเท่าที่มีรายงานในปัจจุบัน ยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ของ MMP-2 กับโรคปริทันต์ได้อย่างชัดเจนนัก

ลักษณะเฉพาะประการหนึ่งของเอนไซม์ MMP รวมทั้ง MMP-2 คือเอนไซม์จะถูกหลั่งออกมาในรูป latent form ซึ่งอยู่ในรูปที่ต้องถูกกระตุ้นจึงจะทำงาน และต้องการการกระตุ้นเพื่อให้เปลี่ยนเป็นรูป active form โดยการตัดส่วน propeptide domain ออก¹³ กลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP จัดเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ โดยการเสียสมดุลของการควบคุมการกระตุ้นการทำงานจะเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ ต้องการหาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตที่เพาะเลี้ยงได้จากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยกับเอนไซม์ MMP-2 ที่สร้างขึ้นโดยเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือกของมนุษย์ โดยศึกษาอิทธิพลของสารที่แบคทีเรียหลั่งออกมา ในการเหนี่ยวนำการสร้าง และการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ซึ่งอาจมีส่วนสัมพันธ์กับการรบกวนความสมดุลของเอนไซม์ในเนื้อเยื่อปริทันต์ และนำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อและก่อให้เกิดโรคในที่สุด

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต

แบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตได้จากน้ำในร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์ที่มารับการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การเก็บน้ำในร่องลึกปริทันต์จะเลือกเก็บจากร่องที่มีความลึกอย่างน้อย 6 มิลลิเมตร จากผู้ป่วยที่ไม่มีโรคทางระบบที่อาจมีผลกระทบต่อสถานะของโรคปริทันต์ รวมทั้งไม่ได้รับยาปฏิชีวนะและยังไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน การเก็บน้ำในร่องลึกปริทันต์จะตัดแปลงจากวิธีที่ได้เคยมีการรายงานไว้โดย Kuvatanasuchati และ Laousrisin²⁹ เล็กน้อยโดยเริ่มด้วยการกำจัดคราบจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณเหนือของเหงือกออกให้หมด แล้วใช้แท่งกระดาษ (paper point) ที่ปราศจากเชื้อสอดลงในร่องลึกปริทันต์จนถึงส่วนก้นของร่อง ทิ้งไว้ 10 วินาที จากนั้นจึงนำแท่งกระดาษนี้ใส่ลงในสารละลาย RTF (Reduced transport fluid) ซึ่งมีสารรีดิวซ์

เป็นองค์ประกอบเพื่อทำลายออกซิเจนในสารละลาย^{30,31} และนำไปเพาะเลี้ยงใน anaerobic chamber (Forma scientific, model 1016, USA) โดยเลี้ยงใน Tryptic soy broth เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน โดยให้มีส่วนผสมของอากาศประกอบด้วยก๊าซไนโตรเจนร้อยละ 85 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 10 และก๊าซไฮโดรเจนร้อยละ 5

ปริมาณของแบคทีเรียจะวัดโดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร และปรับปริมาณของน้ำเลี้ยงเชื้อให้มีจำนวนแบคทีเรียที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ในทุกการทดลอง จากนั้นจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ระดับความเร็ว 3000g เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกส่วนของเชื้อออกจากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ น้ำเลี้ยงเชื้อที่เก็บได้จะถูกนำไปกรองด้วยแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอนเมตร เพื่อกำจัดเอาส่วนของเชื้อที่ยังหลงเหลืออยู่ออกให้หมด น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้นี้จะประกอบด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย และต่อไปจะเรียกว่า สารหลังจากแบคทีเรีย³²

สารหลังจากแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองจะเก็บจากผู้ป่วย 3 คน โดยสารหลังที่ได้จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถูกนำมาใช้ในการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเหงือก

เซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก จะเตรียมจากชิ้นเหงือกที่ได้จากผู้ป่วยอายุ 18-25 ปี ที่มาดอนฟันกรามล่างซี่สุดท้ายที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยพื้นที่ถอนนั้นเนื่องจากการจัดฟันหรือเป็นฟันคุดโดยที่ไม่มีการอักเสบของฟันหรือเหงือก ชิ้นเนื้อเหงือกที่ติดอยู่กับคอฟันที่ถูกถอน จะถูกตัดออกมาเพาะเลี้ยงตามวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว³³ โดยมีวิธีการคือ ชิ้นเนื้อเหงือกที่ได้มาจะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซอลายด์ (phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อหลายครั้ง จากนั้นจึงตัดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร วางในจานเลี้ยงเซลล์ (Nunc) และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) ที่ประกอบด้วยซีรัมร้อยละ 10 (10% fetal calf serum, Gibco) กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM Glutamine, Gibco) เพนิซิลลิน 100 ยูนิต/มิลลิลิตร (100 IU/ml penicillin, Gibco) สเตรปโตมัยซินซัลเฟต 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (100 µg/ml streptomycin sulfate,

Gibco) และแอมโฟเทอริซินบี 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (0.25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B, Gibco) ขึ้นเนื้อเหงือกจะถูกเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เซลล์จะเคลื่อนออกจากชิ้นเนื้อและเจริญจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์ภายใน 2 สัปดาห์ จากนั้นจะถูกถ่ายลงจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 การทดลองนี้ จะใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วย 3 คน โดยใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-7

การกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย

เซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (Nunc) ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์/หลุม/มิลลิลิตร เป็นเวลาหนึ่งวัน จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มีซีรั่ม แต่ประกอบด้วยสารประกอบต่อไปนี้ คือ ITS (Insulin-Transferin-Selenium), Sodium pyruvate, non-essential amino acid, vitamin mixture และ bovine serum albumin³⁴ (Gibco) เป็นเวลาอีก 1 คืน ก่อนที่จะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์อีกครั้งโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่มเหมือนข้างต้น พร้อมทั้งเติมสารหลังจากแบคทีเรียในอัตราส่วนสารหลัง/อาหารเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 0 (กลุ่มควบคุม), 1/100, 1/50, 1/25, 1/10 และ 1/5 โดยในกลุ่มควบคุมจะเติม tryptic soy broth ลงในปริมาณเท่ากับปริมาณของสารหลังที่ใช้กระตุ้นเซลล์แล้วเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ในอีกการทดลองหนึ่ง สารหลังจากแบคทีเรียจะถูกต้มเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลายโครงสร้างของโปรตีนหรือเอนไซม์ในสารหลังก่อนที่จะนำมากระตุ้นเซลล์เหมือนข้างต้น^{32,35,36}

เพื่อเป็นการตรวจสอบกลไกการกระตุ้นเซลล์ของสารหลังจากแบคทีเรีย เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย actinomycin D 0.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือ cycloheximide 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาทีก่อนที่จะกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรียอีก 24 ชั่วโมง (actinomycin D และ cycloheximide ได้จาก Sigma, USA)

การวัดความเป็นพิษด้วยเทคนิค MTT assay

ในการวัดความเป็นพิษของสารหลังจากแบคทีเรีย วัดโดย MTT assay³⁷ เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม เช่นเดียวกับข้างต้น และกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรียในปริมาณต่าง ๆ กันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยอาหารเลี้ยงเซลล์

จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มี phenol red และมี MTT ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน 4 ชั่วโมงสุดท้ายของการกระตุ้น

เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์ถูกดูดออก แล้วเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึก formazan ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลาย MTT จากนั้นจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร

การวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธีย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู (methylene blue assay)

เมื่อครบเวลาในการกระตุ้นเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเก็บเพื่อนำไปวิเคราะห์เอนไซม์ MMP-2 ในขณะที่เซลล์บนจานเลี้ยงจะถูกตรึงด้วยฟอร์มาดีไฮด์ (formaldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 4 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์โซลยาค์เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะทำการวัดจำนวนเซลล์โดยการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูตามวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว³⁸ โดยมีวิธีการคือ เซลล์ที่ถูกตรึงแล้วจะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์โซลยาค์ 1 ครั้งแล้วล้างด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ (borate buffer) ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) 8.5 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์อีก 1 ครั้ง จากนั้นจึงย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจึงล้างสีส่วนเกินด้วยบอเรตบัฟเฟอร์อย่างน้อย 4 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วทำลายด้วยสารละลายอัลกอฮอล์กับกรดไฮโดรคลอริก สัดส่วน 1:1 หลุมละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 667 นาโนเมตร

การวิเคราะห์เอนไซม์ MMP-2 ด้วยวิธี Zymography

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้จากการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์หาเอนไซม์ MMP-2 ด้วยวิธี zymography ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกผสมกับ Laemmli buffer³⁹ แล้วนำไปแยกด้วยไฟฟ้าใน polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นของ acrylamide ร้อยละ 10 และมีส่วนผสมของ gelatin ในปริมาณ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย gelatin จะเป็นซับสเตรท (substrate) สำหรับเอนไซม์ MMP-2 และปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้จะเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่เท่ากัน โดยใช้ค่าจำนวนเซลล์จากการวัดด้วยสีเมทิลีนบลูข้างต้น

เมื่อเสร็จการแยกด้วยไฟฟ้าแล้ว gel จะถูกล้างด้วยสาร

ละลาย TritonX-100 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 สามารถ รอบ ละ 10 นาที ก่อนนำไปป้อนด้วยสารละลาย developing buffer (0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl pH7.5, 0.1% Brij 35) เป็นเวลา 1 คืนที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงย้อมด้วย Brilliant Blue R 250 (Sigma) ความเข้มข้น ร้อยละ 0.5 ในสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 40 และ กรดอะซิติกร้อยละ 10 แล้วล้างด้วยสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 5 และกรดอะซิติกร้อยละ 7.5⁴⁰ บริเวณที่มีเอนไซม์ MMP-2 จะปรากฏเป็นแถบใสบน gel สีน้ำเงิน

ผลการศึกษา

ผลของสารหลังจากแบคทีเรียที่มีต่อเอนไซม์ MMP-2 แสดงไว้ในรูปที่ 1 ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เอนไซม์ MMP-2 ด้วย เทคนิค zymography ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อกระตุ้น เซลล์ด้วยสารหลังจากแบคทีเรียในปริมาณต่าง ๆ กันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะพบเอนไซม์ MMP-2 ในรูปที่เป็น active form ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า latent form ประมาณ 8-10 กิโลดาลตัน โดย latent form ของเอนไซม์ MMP-2 จะมีน้ำหนัก โมเลกุลประมาณ 72 กิโลดาลตัน ในขณะที่ active form ของเอนไซม์จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 62-64 กิโลดาลตัน ส่วนการเปลี่ยนแปลงของระดับของเอนไซม์ MMP-2 ในอาหาร เลี้ยงเซลล์จะเห็นได้ไม่ชัดเจนนัก นอกจากนี้ ยังพบว่าผลของ สารหลังจากแบคทีเรียในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 จะแปรผันตามปริมาณของสารหลังที่ใช้กระตุ้นเซลล์ โดยเริ่มเห็นการกระตุ้นชัดเจนที่อัตราส่วนของสารหลัง/อาหาร เลี้ยงเซลล์ 1/50

เมื่อทำการทดสอบระดับความเป็นพิษของสารหลังจาก แบคทีเรียที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือกด้วยเทคนิค MTT assay (รูปที่ 2) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับของสารหลัง จากแบคทีเรียที่กระตุ้นการทำงานของ MMP-2 คือที่อัตราส่วน ของสารหลัง/อาหารเลี้ยงเซลล์ 1/100 ถึง 1/10 จะเป็นระดับที่ ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และในการทดลองที่เหลือทั้งหมด จะใช้อัตราส่วน 1/50

เพื่อตรวจสอบว่า แถบใสที่ปรากฏในรูปที่ 1 เกิดจากเอนไซม์ MMP-2 แผ่นเจลจะถูกป้อนในสารละลาย developing buffer ที่มี EDTA (Ethylenediaminetetra-acetic acid) ที่ความ เข้มข้นร้อยละ 1.5 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ MMP ผลม อยู่ EDTA จะยับยั้งการทำงานของ MMP-2 ทำให้เอนไซม์ไม่

สามารถย่อย gelatin ใน gel จึงไม่พบแถบใส ดังแสดงในรูปที่ 3 เพื่อเป็นการยืนยันความสามารถของสารหลังจากแบคทีเรีย ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์สารหลังจากแบคทีเรียที่เพาะ เลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วย 3 คนถูกนำมากระตุ้นเซลล์ เพาะเลี้ยงจากเหงือก ผลการทดลองในรูปที่ 4 แสดงว่าสารหลัง จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากผู้ป่วยโรคปริทันต์ทั้งสามราย สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นอกจากนี้ ยังพบว่า สารหลังจากแบคทีเรียเหล่านี้ ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ เอนไซม์ MMP-2 เมื่อทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อ เหงือกของผู้ป่วยรายอื่น ๆ ด้วย (ผลการทดลองที่ไม่ได้แสดงไว้)

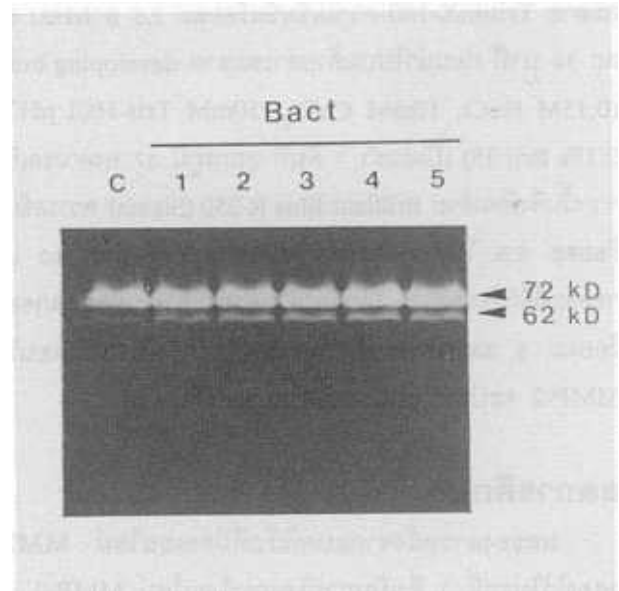
เมื่อทำการกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย actinomycin D ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งกระบวนการสร้าง mRNA (transcription process)⁴¹ หรือ cycloheximide ซึ่งสามารถยับยั้ง กระบวนการสร้างโปรตีน (translation process)⁴² เป็นเวลา 30 นาทีก่อนที่จะกระตุ้นเซลล์ด้วยสารหลังจากแบคทีเรียเป็น เวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองในรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าการ ยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีนทำให้ระดับของเอนไซม์ MMP-2 ลดลงอย่างมากทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารหลังจาก แบคทีเรีย และไม่ปรากฏ active form ของ MMP-2 ในทั้งสองกลุ่ม แต่ในสภาวะที่ยับยั้งการสร้าง mRNA ระดับของ เอนไซม์ในทั้งสองกลุ่มลดลงไม่มากนัก และยังคงปรากฏ active form ของ MMP-2 ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย อย่างไรก็ดี ระดับของ active form ที่ปรากฏขึ้นจะน้อยกว่า ระดับที่พบในการทดลองอื่น ๆ เนื่องจากการทดลองนี้ เก็บผลที่ 24 ชั่วโมง แทนที่จะเป็น 48 ชั่วโมงเช่นการทดลองอื่น ๆ เนื่อง จากการคงอยู่ของ actinomycin D และ cycloheximide ใน อาหารเลี้ยงเซลล์นานกว่า 24 ชั่วโมง จะเป็นพิษต่อเซลล์ (ผล การทดลองที่ไม่ได้แสดงไว้)

เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของสารในสารหลังจากแบคทีเรีย ที่มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 สารหลังจาก แบคทีเรียจะถูกนำไปต้มเป็นเวลา 15 นาที ก่อนที่จะนำไปกระตุ้น เซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการต้มจะเป็นการทำลายสาร จำพวกเอนไซม์ในสารหลังจากแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า ผลของสารหลังที่ถูกต้มเป็นเวลา 15 นาที ยังคงมีความสามารถ ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ที่หลั่งออกจากเซลล์ เพาะเลี้ยงจากเหงือก ซึ่งแสดงว่าสารหลังที่สามารถกระตุ้นการ ทำงานของ MMP-2 จะมีคุณสมบัติที่ทนต่อความร้อนได้ (รูปที่ 6)

รูปที่ 1 ผลของสารหลังจากแบคทีเรียในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2
เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยอัตราส่วนของสารหลัง/อาหารเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 1/100, 1/50, 1/25, 1/10, และ 1/5 (แถวที่ 1-5 ตามลำดับ) การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ถูกวิเคราะห์ด้วย gelatin zymography ผลการทดลองแสดงว่าสารหลังจากแบคทีเรียสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (c) และผลของการกระตุ้นจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารหลังที่ใช้กระตุ้น หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-2 ที่ 72 kDa (latent) และ 62 kDa (active), Bact = สารหลังจากแบคทีเรีย

Fig. 1 The effect of bacterial supernate on MMP-2 activation.

Human gingival fibroblasts were treated with bacterial supernate for 72 hours at the dilution of bacterial supernate/culture medium 1/100, 1/150, 1/25, 1/10, and 1/5 (lane 1-5, respectively). MMP-2 activation was examined by gelatin zymography. The results indicate that bacterial supernate can activate MMP-2 in a dose dependent manner when compared with control (c). Arrow heads indicate the 72 kDa (latent) and 62 kDa (active). Bact = bacterial supernate.

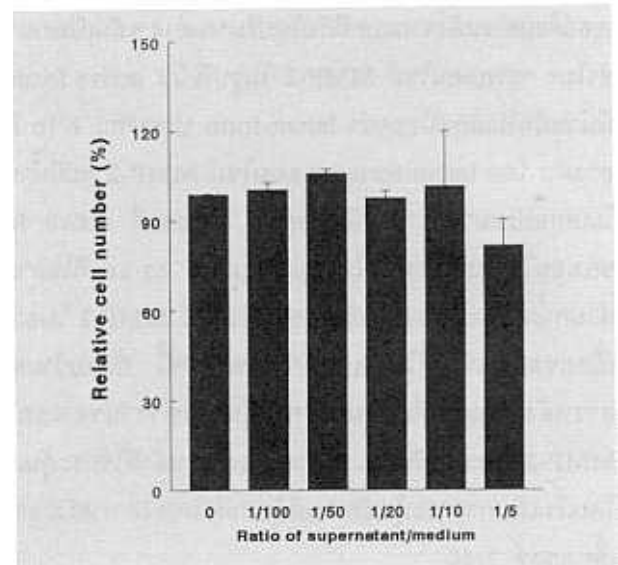


รูปที่ 2 กราฟแสดงความเป็นพิษของสารหลังจากแบคทีเรีย

เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังเหมือนการทดลองข้างต้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดความเป็นพิษด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ MTT จากนั้นคำนวณหาจำนวนเซลล์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน แกนตั้งของกราฟแสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ ส่วนแกนนอนแสดงอัตราส่วนของสารหลัง/อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการกระตุ้นผลการทดลองแสดงว่า ปริมาณเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในทุกความเข้มข้นของสารหลังจากแบคทีเรียที่ใช้ยกเว้นที่อัตราส่วน 1/5 ซึ่งมีจำนวนลดลงประมาณร้อยละ 20

Fig. 2 Graph shows the toxicity of bacterial supernate.

Cells were grown and treated as described above for 24 hours. Cytotoxicity was measured by MTT assay and converted into cell number by comparing with the standard curve. The Y-axis is the percentage of cell number. The X-axis is the ratio of bacterial supernate used in the experiment. The result indicates that the cell number is not affected by any dilutions of bacterial supernate except at the dilution 1/5 which cell number decreases approximately 20%

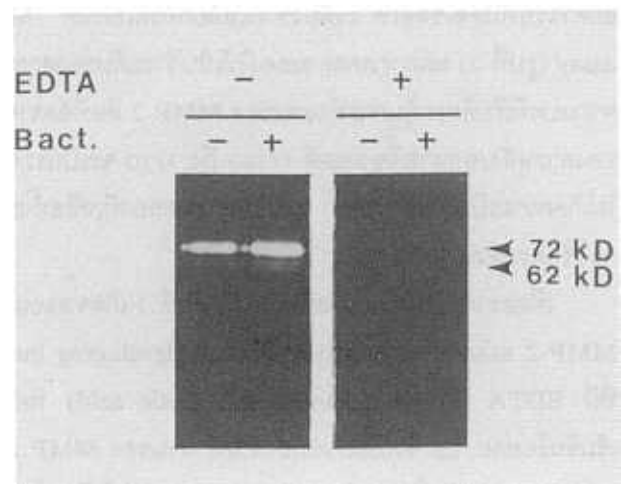


รูปที่ 3 การยับยั้งการทำงานของ MMP-2 ด้วย EDTA

เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารหลังจากแบคทีเรีย ที่อัตราส่วน 1/50 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์จากกลุ่มควบคุม (Bact-) และกลุ่มที่ถูกกระตุ้น (Bact+) ถูกวิเคราะห์ด้วย gelatin zymography แล้วบ่มใน developing buffer ที่มี (+) หรือไม่มี (-) EDTA ผลการทดลองแสดงว่า แถบสีจะหายไปเมื่อบ่มใน developing buffer ที่มี EDTA. หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-2 ที่ 72 และ 62kDa

Fig. 3 Inhibition of MMP-2 by EDTA.

Cells were cultured in the absence (Bact-) or presence (Bact+) of bacterial supernate at the dilution of 1/50 for 48 hours. MMP-2 from culture medium was analyzed with gelatin zymography and incubated in the developing buffer with (+) or without (-) EDTA. Clear band disappeared when the gel was incubated in the developing buffer with EDTA. Arrow heads indicate the position of 72 and 62 kDa.

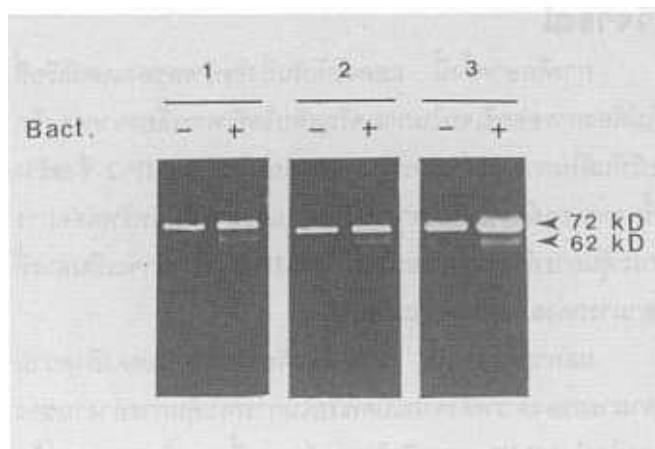


รูปที่ 4 ผลของสารหลังจากแบคทีเรียที่เตรียมจากผู้ป่วย 3 ราย

สารหลังจากเตรียมจากผู้ป่วย 3 ราย และใช้กระตุ้นเซลล์ที่ความเข้มข้น 1/50 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gelatin zymography แสดงว่า สารหลังจากผู้ป่วยทั้งสาม สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้ หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-2 ที่ 72 และ 62 kDa, Bact = สารหลังจากแบคทีเรีย, 1,2,3 หมายถึงสารหลังจากผู้ป่วยรายที่ 1,2 และ 3

Fig. 4 The effect of bacterial supernate prepared from 3 patients.

Bacteria supernate was prepared from 3 patients and was used to activate cells at 1/50 dilution for 48 hours. Gelatin zymography analysis indicated that all preparations of bacterial supernate could similarly activate MMP-2. Arrow heads indicate the position of MMP-2 at 72 and 62 kDa. Bact = bacterial supernate, 1,2,3 = bacterial supernate from 3 patients.

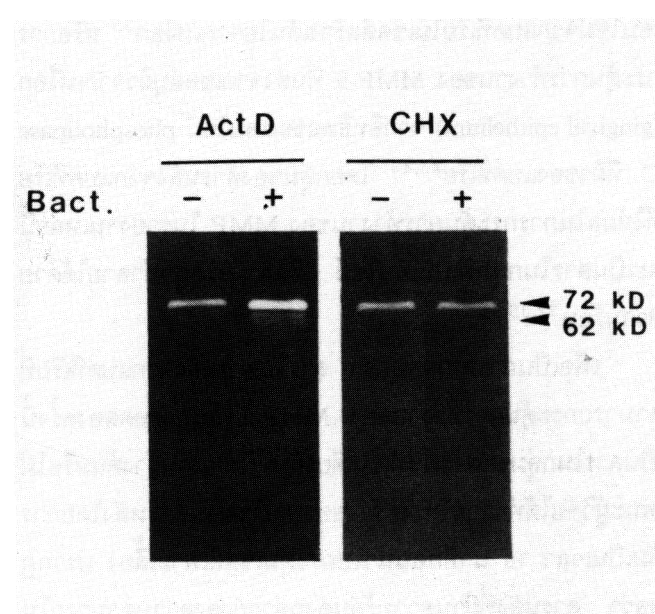


รูปที่ 5 ผลของ actinomycin D และ cycloheximide ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจากแบคทีเรีย

Actinomycin D (Act D) หรือ cycloheximide (CHX) ถูกเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 นาทีก่อนการกระตุ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลจาก gelatin zymography แสดงว่า actinomycin D ไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 (เปรียบเทียบ Act D bact+ กับ Act D bact-) ในขณะที่ cycloheximide ยับยั้งการเกิด MMP-2 ที่ตำแหน่ง 62 kDa (CHX bact+). หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-2 ที่ 72 และ 62 kDa, Bact = สารหลังจากแบคทีเรีย

Fig. 5 The effect of actinomycin D and cycloheximide on the activation of MMP-2 by bacterial supernate.

Actinomycin D (Act D) and cycloheximide (CHX) was added into culture medium for 30 minutes prior to the 24 hour-activation with bacterial supernate. Gelatin zymography indicated that activation D had no inhibitory effect on MMP-2 activation (compared Act D bact+ with Act D bact-), while cycloheximide eliminate the 62 kDa band (CHX bact+). Arrow heads indicate the position of MMP-2 at 72 and 62 kDa. Bact = bacterial supernate.

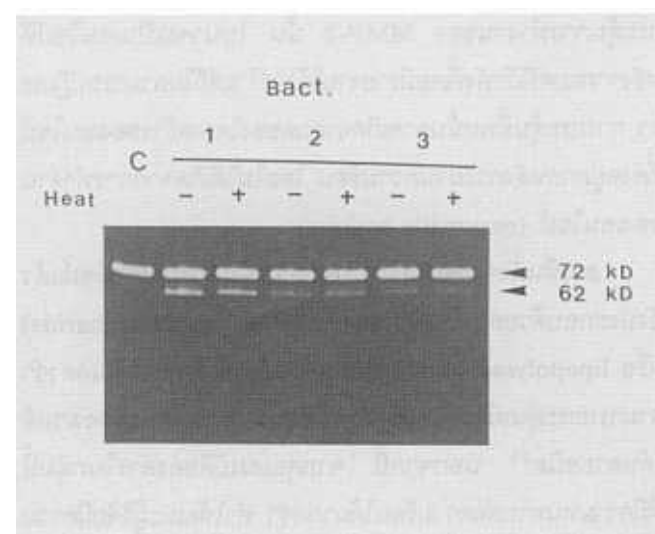


รูปที่ 6 ผลของสารหลังจากแบคทีเรียที่ผ่านการต้มในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2

สารหลังจากผู้ป่วย 3 ราย ทั้งที่ผ่านการต้ม (heat+) และไม่ผ่านการต้ม (heat-) ถูกนำมากระตุ้นเซลล์ด้วยอัตราส่วนของสารหลัง/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1/50 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gelatin zymography แสดงว่าสารหลังทั้งสองกลุ่มสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้คล้ายคลึงกัน หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-2 ที่ 72 และ 62 kDa, Bact = สารหลังจากแบคทีเรีย, 1,2,3 หมายถึงสารหลังจากผู้ป่วยรายที่ 1,2 และ 3

Fig. 6 The effect of heat-inactivated bacterial supernate on MMP-2 activation.

Bacterial supernate from 3 patients either heat-inactivated (heat+) or non-heated (heat-) were used to activate human gingival fibroblast at dilution of bacterial supernate/medium 1/50. Gelatin zymography analysis reveals that both types of bacterial supernate could similarly activate MMP-2. Arrow heads indicate the position of MMP-2 at 72 and 62 kDa. Bact = bacterial supernate, 1,2,3 = bacterial supernate from 3 different patients.



วิจารณ์

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งสร้างขึ้นจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก และสารที่มีอิทธิพลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 นี้ น่าจะเป็นสารที่สามารถคงสภาพในความร้อนได้

ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับรายงานที่แสดงถึงความสามารถของสารหลังจากแบคทีเรียในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP บางชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยง เช่น การกระตุ้นการหลั่ง MMP-1 ในรูปที่พร้อมจะทำงานจากการเหนี่ยวนำของเอนไซม์จากแบคทีเรียในเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก³⁵ หรือการกระตุ้นการทำงานของ MMP-9 ที่หลังจากเซลล์บุผิวจากเหงือก (gingival epithelium) จากอิทธิพลของเอนไซม์ phospholipase C ที่ผิวของแบคทีเรีย^{43,44} โดยกลุ่มของสารหลังจากแบคทีเรียที่ให้ผลในการกระตุ้นการทำงานของ MMP ในรายงานเหล่านี้จะเป็นสารในกลุ่มที่เป็นเอนไซม์ ซึ่งสามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อน^{32,35,36}

เพื่อเป็นการตรวจสอบว่า สารในสารหลังจากแบคทีเรียที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในการทดลองครั้งนี้เป็นสารในกลุ่มของเอนไซม์เช่นเดียวกับที่มีรายงานข้างต้นหรือไม่ คณะผู้วิจัยได้ทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ในสารหลังโดยการต้มเป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำไปกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยง ปรากฏผลว่า สารหลังที่ผ่านความร้อนดังกล่าวยังคงความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ดังนั้น จากผลการทดลองที่ได้ทำให้นักคณะผู้วิจัยเชื่อว่า สารในสารหลังที่มีอิทธิพลต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้น ไม่น่าจะเป็นเอนไซม์ที่หลังจากแบคทีเรียดังที่เคยมีรายงานไว้^{35,43} แต่ก็ไม่สามารถปฏิเสธว่า การกระตุ้นที่พบนั้นอาจเกิดจากผลของโครงสร้างของเอนไซม์ที่คงอยู่ภายหลังการผ่านความร้อน โดยไม่ได้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ (enzymatic activity)

สารที่หลังจากแบคทีเรีย นอกจากสารจำพวกเอนไซม์แล้วยังประกอบด้วยสารในกลุ่มของ น้ำตาล (polysaccharide) หรือ lipopolysaccharide อีกหลายกลุ่ม ซึ่งมีรายงานแสดงว่าสามารถกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์ได้หลายชนิด⁴⁵ นอกจากนี้ จากคุณสมบัติของสารในกลุ่มนี้ที่มีความทนทานต่อความร้อนได้มากกว่า ทำให้นักคณะผู้วิจัยมีความเห็นว่า สารในกลุ่มนี้ อาจจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในการทดลองครั้งนี้

Lipopolysaccharide เป็นสารหลังจากแบคทีเรียที่มีอิทธิพลต่อเซลล์หลายชนิด รวมทั้งเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก^{45,46} โดยสารในกลุ่มนี้ จะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างและหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cytokines) โดยเฉพาะกลุ่มของ interleukin และ tumor necrosis factor รวมทั้งเพิ่มการสร้างและหลั่งสารในกลุ่ม prostaglandins ด้วย และเซลล์ที่สามารถตอบสนองต่อสารกลุ่มนี้ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาวจำพวก mononuclear cells เซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) และเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) ผลของการเพิ่มไซโตไคน์และ prostaglandins จะมีผลต่อการกระตุ้นการสร้างและหลั่งเอนไซม์ MMP ในเนื้อเยื่อ และนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวาง

แม้ว่าจะมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างบทบาทของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและ prostaglandins ในการกระตุ้นการหลั่งและการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มของ MMP หลายชนิด เช่น MMP-1, MMP-8 และ MMP-3 แต่ผลที่มีต่อ MMP-2 กลับไม่ชัดเจน และยังไม่มียางานที่แสดงถึงผลของ inflammatory cytokines และ prostaglandins ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงไม่คิดว่า ผลของไซโตไคน์ และ prostaglandins จะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ที่เกิดขึ้น แต่ก็ไม่สามารถตัดอิทธิพลของปัจจัยจากไซโตไคน์ และ prostaglandins ออกไปได้เช่นกัน ดังนั้นความเกี่ยวพันของ cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ยังจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

อย่างไรก็ดี มีรายงานเมื่อเร็ว ๆ นี้ ที่แสดงให้เห็นว่า สารในกลุ่มของ lipopolysaccharide หรือ LPS สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ที่สร้างจากเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากมดลูก และจากเซลล์บุหลอดเลือด⁴⁷⁻⁴⁸ ประกอบกับความสามารถของแบคทีเรียกรัมลบชนิดแท่งในการหลั่ง LPS^{7,45} ทำให้นักนักของความเชื่อที่ว่า LPS ในสารหลังเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในการทดลองนี้มีความเป็นไปได้เพิ่มมากขึ้น

ในการทดลองครั้งนี้ ยังพบว่าผลของสารหลังจากแบคทีเรียในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มี actinomycin D ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ RNA (transcription) โดยการจับกับเกลียวของสารพันธุกรรม (DNA) เป็นผลให้เอนไซม์ RNA polymerase ไม่สามารถเคลื่อนไปบนสารพันธุกรรมเพื่อสังเคราะห์ RNA ได้⁴¹ ดังนั้น การพบการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลัง

จากแบคทีเรียในสภาวะที่มี actinomycin D แสดงว่ากระบวนการที่เกิดขึ้นไม่ต้องการการสร้าง RNA เพิ่มเติมจาก RNA ที่มีอยู่แล้วภายในเซลล์ แต่ในสภาวะที่มี cycloheximide ซึ่งสามารถยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีน (translation)⁴² พบว่าปริมาณของ MMP-2 ที่ตรวจสอบได้จาก zymography จะลดลง เนื่องจากเซลล์ไม่สามารถสร้าง MMP-2 เพิ่มเติม และ MMP-2 ที่ตรวจพบได้เป็นเอนไซม์ที่เซลล์ได้สร้างและเก็บไว้ใน secreted vesicles ภายในเซลล์อยู่แล้ว รวมทั้งไม่พบ MMP-2 ในรูปที่พร้อมทำงาน แสดงว่ากระบวนการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยสารหลังจากแบคทีเรียในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเหงือก แม้จะไม่ต้องการสร้าง RNA ขึ้นเพิ่มเติม แต่จำเป็นต้องการการสร้างโปรตีนขึ้นใหม่

ผลจากการทดลองครั้งนี้ คณะผู้วิจัยยังไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่า กลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 เกิดขึ้นได้อย่างไร เท่าที่ปรากฏรายงานในปัจจุบัน พบว่ากลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP เกือบทุกชนิด ยกเว้น MMP-2 จะเกิดจากการตัดส่วน pro-domain ออกโดยเอนไซม์ในกลุ่ม serine proteases ในขณะที่ MMP-2 จะไม่สามารถถูกกระตุ้นการทำงานด้วย serine proteases เช่นเดียวกับ MMP ชนิดอื่น ๆ แต่จะต้องอาศัยเอนไซม์ MMP บนผิวเซลล์ที่ชื่อว่า MT-MMP เป็นตัวกระตุ้น⁴⁹ แม้จะมีรายงานว่าเซลล์สร้างเส้นใยสามารถสร้างเอนไซม์ MT-MMP บนผิวเซลล์ แต่ยังไม่เคยมีรายงานว่าเอนไซม์ตัวนี้อยู่บนผิวเซลล์สร้างเส้นใยจากเหงือก ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป แต่จากรายงานของ Kim และ Koh⁴⁸ ที่แสดงว่า LPS สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์บุหลอดเลือดได้นั้น พบว่า LPS จะกระตุ้นการทำงานของ MT-MMP บนผิวเซลล์ผ่านทาง NF-kB ซึ่งเป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (gene) หลายชนิด เป็นผลให้ MMP-2 ในรูปที่พร้อมจะทำงานมีระดับเพิ่มสูงขึ้น แต่ในรายงานดังกล่าวนี้มีได้ระบุว่า LPS ที่ใช้ในการทดลองได้จากแบคทีเรียชนิดใด

นอกจากผลในการกระตุ้นการทำงานของ MT-MMP แล้ว ยังมีรายงานว่า LPS จาก *E.coli* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 จาก serine protease activity ในตัวเองได้เช่นกัน โดยรายงานของ Takeda และคณะ⁴⁷ พบว่าการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 จากเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากมดลูกโดย LPS ของ *E.coli* จะถูกยับยั้งได้ด้วย aprotinin ซึ่งเป็น specific serine protease inhibitor อย่างไรก็ดี ยัง

ไม่มีความชัดเจนว่า LPS จากแบคทีเรียในรอยปริทันต์จะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ LPS จาก *E.coli* หรือไม่

ผลของสารหลังจากแบคทีเรียในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในรายงานนี้ แม้จะยังไม่สามารถตอบคำถามจำนวนมากได้อย่างชัดเจน แต่ก็นับเป็นจุดเริ่มต้นในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในรอยปริทันต์กับเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ซึ่งแม้ว่า MMP-2 จะไม่พบในน้ำร่องเหงือก แต่จากการที่ระดับของ MMP-2 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์ รวมทั้งความสามารถในการย่อยคอลลาเจนชนิดที่ I และชนิดที่ IV ทำให้น่าเชื่อว่าเอนไซม์นี้ จะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ การศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียและ MMP-2 ตลอดจนถึงกลไกที่เกิดขึ้น จะเป็นประโยชน์ต่อการทำงานเข้าใจอันจะนำไปสู่การป้องกันและรักษาโรคปริทันต์ในอนาคตต่อไป

สรุป

งานวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสารหลังจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากร่องลึกปริทันต์ของผู้ป่วยโรคปริทันต์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์ กลไกการกระตุ้นการทำงานที่เกิดขึ้นไม่ต้องการการสร้าง RNA ใหม่ แต่ต้องการการสร้างโปรตีนใหม่ และสารที่มีอิทธิพลในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นี้ เป็นสารที่สามารถคงสภาพในความร้อนได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อาจารย์และบุคลากรภาควิชา ศัลยศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อในการเก็บเนื้อเยื่อเหงือกจากผู้ป่วย อาจารย์และนิสิตปริญญาโท ภาควิชาปริทันต์วิทยา ที่เอื้อเฟื้อในการเก็บน้ำในร่องเหงือกจากผู้ป่วย อาจารย์และบุคลากรภาควิชา กายวิภาคศาสตร์ ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่สำหรับการทำงานวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก กองทุนอุดหนุนการวิจัย โครงการวิจัยทางทันตกรรมคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับทุนสนับสนุนส่วนใหญ่จาก กองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (สกว.) ประจำปี 2543

เอกสารอ้างอิง

- Listgarten MA. Pathogenesis of periodontitis. J Clin Periodontol 1986;13:418-25.
- Moore WEC, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burrmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing destructive progression. J Clin Periodontol 1991;18:729-39.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 1994;5:78-111.
- Birkedal-Hansen H, Taylor RE, Zambon JJ, Baewa PK, Neiders M. Characterization of collagenolytic activity from strains of *Bacteroides gingivalis*. J Periodontal Res 1988;23:258-64.
- Robertson PB, Lantz M, Marucha PT, Kornman KS, Trummel CL, Holt SC. Collagenolytic activity associated with bacteroides species and Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Periodontal Res 1982;17:275-83.
- Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Kontinen YT, Lindy O, Saari H, Uitto VJ.. Identification of protease from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenase. Infect 1992; 60:4491-5.
- Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol 1993;64:474-84.
- DeCarlo AA Jr., Windsor LJ, Bodden MK, Harber GL, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and noval processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. J Dent Res 1997;76:1260-70.
- Payne JB, Peluso JF Jr., Nichols FC. Longitudinal evaluation of peripheral blood monocyte secretory function in periodontitis-resistant and periodontitis-susceptible patients. Arch Oral Biol 1993;38:309-17.
- Garrison SW, Nichols FC. LPS-elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE₂ but not IL-1 beta in patients with adult periodontitis. J Periodontal Res 1989;24:88-95.
- McFarland CG, Reynolds JJ, Meikle MC. The release of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. J Periodontal Res 1990;25:207-14.
- Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000 1997;14:112-43.
- Ellerbroek SM, Stack MS. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. Bioessays 1999;21:940-9.
- Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. Curr Opin Cell Biol 1998;10:602-8.
- Sorsa T, Uitto V-J, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. J Periodontal Res 1988;23:386-93.
- Kubota T, Nomura T, Takahashi T, Hara K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. Arch Oral Biol 1996;41:253-62.
- Romanelli R, Mancini S, Lashinger C, Overall CM, Sodek J, McCulloch CA. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. Infect Immun 1999;67:2319-26.
- Golub LM, Siegel K, Ramamurthy NS, Mandel AD. Some characteristics of collagenase activity in gingival crevicular fluid and its relationship to gingival disease in humans. J Dent Res 1976;55:1049-57.
- Overall CM, Weibkin OW, Thonard JC. Demonstration of tissue collagenase activity in vivo and its relationship to inflammation severity in human gingiva. J Periodontal Res 1987;22:81-8.
- Uitto V-J, Suomalainen K, Sorsa T. Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. J Periodontal Res 1990;25:135-42.
- Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschésch H, Haeria A, Kinane DF, Kontinen YT, Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. J Clin Periodontol 1996;23:1127-32.
- Heikinheimo K, Sato T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. J Dent Res 1995;74:1226-34.
- Makela M, Salo T, Uitto V-J, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. J Dent Res 1994;73:1397-406.
- Woessner JF Jr., Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. FASEB J 1991;5:2145-54.
- Ingman T, sorsa T, Lindy O, Koshi H, Kontinen YT. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. J Clin Periodontol 1994;21:26-31.
- Amies RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzymes catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4 and 1/4 length fragments. J Biol Chem 1995;270:5872-6.
- Kerkvliet EHM, Docherty AJP, Beertsen W, Everts V. Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase A (MMP-2) but not with collagenase. Matrix Biol 1999;17:373-80.
- Creemers LB, Jansen ID, Docherty AJP, Reynolds JJ, Beertsen W, Everts V. Gelatinase A (MMP-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue. Matrix Biol 1998;17:35-46.
- Kuvatanasuchati J, Laoursisin N. Identification of bacteria in periodontal pockets of Thai periodontitis patients. CU Dent J 1998;21:31-5.
- Syed SA, Loesche WJ, Pope HL, Grenier E. Predominant cultivable flora isolated from human root surface caries plaque. Infect Immun 1972;11:721-31.
- Loesche WJ, Hockett RN, Syed SA. The predominant cultivable flora of tooth surface plaque removed from institutionalized subjects. Arch Oral Biol 1972;17:1311-25.
- Johansson A, Bergenholtz A, Holm SE. Strong cytotoxicity to human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. J Periodontal Res 1996;31:477-82.
- Darongsuwan T, Pavasant P. *In vitro* effect of hydroxyapatite crystal on gingival and periodontal ligament fibroblasts. CU Dent J 1997;20:183-93.
- Yu M, Sato H, Seiki M, Thompson EW. Complex regulation of membrane-type matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation by concanavalin A in MDA-MB-231 human breast cancer cells. Cancer Res 1995;55:3272-7.

35. Uitto V-J, Larjava H, Heino J, sorsa T. A protease of *Bacteroides gingivalis* degrades cell surface and matrix glycoprotein of cultured gingival fibroblasts and induces secretion of collagenase and plasminogen activator. Infect Immun 1989;57:213-8.
36. Wang PL, Shirasu S, Shinohara M, Daito M, Oido M, Kowashi Y, Ohura K. Induction of apoptosis in human gingival fibroblasts by a *Porphyromonas gingivalis* protease preparation. Arch Oral Biol 1999;44:337-42.
37. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
38. Darongsuwan T, Pavasant P. PDGF stimulates proliferation and matrices synthesis in cultured human PDL cells. J Dent Assoc Thai 1999;49:301-11.
39. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
40. Dhanesuan N, Pavasant P. Stimulation of MMP-3 (stromelysin-1) secretion in periodontal ligament fibroblasts by increasing level of intracellular calcium and cyclic AMP *in vitro*. CU Dent J 1998;21:147-55.
41. Stryer L. Biochemistry. 3rd ed., New York:Freeman and company, 1998:714-5.
42. Stryer L. Biochemistry. 3rd ed., New York:Freeman and company, 1988:759.
43. Firth JD, Putnins EE, Larjava H, Uitto V-J. Bacterial phospholipase C upregulates matrix metalloproteinase expression by cultured epithelial cell. Infect Immun 1997;65:4931-6.
44. Ding Y, Uitto V-J, Firth J, Salo T, Maapasalo M, Kontinen YT, et al. Modulation of host matrix metalloproteinase by bacterial virulence factors relevant in human periodontal disease. Oral Dis 1995;1:279-86.
45. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokines-inducing components of periodontopathogenic bacteria. J Periodontal Res 1996;31:393-407.
46. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka s, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. Infect Immun 1992;60:4932-7.
47. Takeda M, Imada K, Sato T, Ito A. Activation of human progelatinase A/ promatrix metallo-proteinase 2 by *Esterichia coli*-derived serine protease. Biochem Biophys Res Commun 2000;268:128-32.
48. Kim HG, Koh GY. Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through a NF-kB dependent pathway. Biochem Biophys Res Commun 2000;269:401-5.
49. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72 kDa type IV collagenase. Isolation of the activated from of the membrane metalloproteinase. J Biol Chem 1995;270:5331-8.

Activation of MMP-2 by bacterial supernate cultivated from periodontal pockets

Kassara Pattamapun¹, D.D.S., M.S.

Thanathorn Tungtong², Thanaphum Osathanon², Woraphat Liwchulaschan²

Jintakorn Kuvatanasuchati³, D.D.S., M.S.

Tussanee Darongsuwan¹, D.D.S., M.S.

Prasit Pavasant¹, D.D.S., Ph.D.

¹Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

²Undergraduate student, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

³Department of Microbiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Abstract

Objective The aim of this study is to focus on the effect of bacterial supernate, cultivated from the patients' periodontal pocket, on the activation of MMP-2 from cultured human gingival fibroblasts.

Materials and methods Anaerobic bacteria from periodontal pockets were cultivated for 5 days. Bacterial supernate, either heat inactivated or non-heated, was added into the culture medium of human gingival fibroblasts for 48 hours in serum-free condition. The cytotoxicity of the supernate was assayed by MTT, while the level of MMP-2 activation was measured by gelatin zymography. In another experiment, the effect of bacterial supernate was studied in the presence of actinomycin D or cycloheximide for 24 hours.

Results Both heat inactivated and non-heated bacterial supernate, in the non-toxic levels, were able to activate MMP-2 in a dose dependent manner. This activation can be blocked by cycloheximide but not actinomycin D.

Conclusion Bacterial supernate from anaerobic bacteria cultivated from periodontal pocket was able to activate MMP-2 secreted from human gingival fibroblasts in vitro. This activation process might be regulated in the translation level.

(CU Dent J 2001;24:1-12)

Key words: bacterial supernate; gingival fibroblasts MMP-2; periodontitis
