



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

อิทธิพลของเอสโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการหลั่ง MMP-1
และ MMP-2 และการแสดงออกของยีน IL-6 และ NOS ของเซลล์
เอ็นดอทีเลียลในสภาวะที่มี IL-1 หรือ LPS

โดย

ทัศนีย์ ขงชัยตระกูล
ประสิทธิ์ ภาวสันต์

617.634
ท365ข

พฤษภาคม ๒๕๔๕

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

อิทธิพลของเอสโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการหลั่ง MMP-1 และ MMP-2 และการแสดงออกของยีน IL-6 และ NOS ของเซลล์เอ็นดีดปริทันต์ในสภาวะที่มี IL-1 หรือ LPS

The influence of estrogen on MMP-1 and MMP-2 secretion, IL-6 and NOS expression in IL-1 or LPS induced PDL cells.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โดย

ทัศนีย์ ยงชัยตระกูล และ ประสิทธิ์ ภาวสันต์

พฤษภาคม 2545

26 JUN 2006

I 22248040

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์และบุคลากรของภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บเนื้อเยื่อฟันจากผู้ป่วย ขอขอบคุณ ทพ. เกษรา ปัทมพันธ์ และ ทพ. สิริลักษณ์ ตีรณธนากุล นิสิตปริญญาเอก สาขาชีววิทยาช่องปาก ที่ให้ความช่วยเหลือในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และทำยาสีฟันขอขอบคุณคณะอนุกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รศ. ทพ. ดร. ทัดฉวี ชงชัยพรกุล

มอบให้แก่สมภรณ์ สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๑๕ ก.พ. ๒๕๕๑.

ชื่อโครงการวิจัย : อิทธิพลของเอสโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการหลั่ง MMP-1 และ MMP-2 และการแสดงออกของยีน IL-6 และ NOS ของเซลล์เอ็นดอทีลียัลในสภาวะที่มี IL-1 หรือ LPS

ชื่อผู้วิจัย : ทศนีย์ ยงชัยตระกูล, ประสิทธิ์ ภาสันต์

เดือนปีที่ทำวิจัยสำเร็จ : พฤษภาคม 2545

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือศึกษาการตอบสนองของเซลล์เอ็นดอทีลียัล เมื่อกระตุ้นด้วยเอสโตรเจน IL-1 β และ LPS โดยลำพัง หรือเมื่อกระตุ้นด้วยเอสโตรเจนร่วมกับ IL-1 β หรือเอสโตรเจนร่วมกับ LPS โดยต้องการตรวจสอบการตอบสนองในแง่การแสดงออกของ IL-6, NOS และการหลั่งเอนไซม์ MMP-1, -2, -3 เซลล์เอ็นดอทีลียัลถูกเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเอ็นดอทีลียัลของมนุษย์ เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ IL-6 และ NOS ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ ส่วนการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-2, -3 จะตรวจสอบด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอตและไซโมกราฟีตามลำดับ หลังจากกระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า เอสโตรเจนที่ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ มีผลกระตุ้นการหลั่ง MMP-3 แต่ไม่มีผลต่อ MMP-1, -2 และไม่มีผลต่อการแสดงออกของ IL-6 และ NOS ในขณะที่ IL-1 β และ LPS มีผลกระตุ้นการแสดงออกของ IL-6 และ NOS และเพิ่มการหลั่ง MMP-1 ประเด็นที่น่าสนใจคือ เอสโตรเจนช่วยเสริมผลของ IL-1 β ในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ IL-6, NOS และ MMP-1 โดยจะทำให้ระดับของ IL-6, NOS และ MMP-1 เพิ่มขึ้นเป็น 2.4, 5 และ 2.3 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ 1.7, 4.2 และ 1.3 เท่า เมื่อกระตุ้นด้วย IL-1 β เพียงลำพัง ในขณะที่เดียวกันเอสโตรเจนยังช่วยเสริมผลของ LPS ด้วย โดยระดับของ NOS และ MMP-1 เพิ่มขึ้นเป็น 3.7 และ 2.9 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับ 2 และ 1.9 เท่า เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ตามลำพัง ผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า ในสภาวะที่มีระดับของฮอโมนเอสโตรเจนเพิ่มสูงขึ้น จะมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์เอ็นดอทีลียัลที่มีต่อสารกระตุ้นที่ก่อให้เกิดการอักเสบ โดยทำให้ระดับของเอนไซม์และไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ระดับของการอักเสบของเนื้อเยื่อเอ็นดอทีลียัลเพิ่มสูงขึ้นในระยะวัยรุ่น หรือในสตรีที่มีครรภ์ ซึ่งมีระดับของฮอโมนเอสโตรเจนเพิ่มสูงขึ้นในกระแสเลือด

Project Title : The influence of estrogen on MMP-1 and MMP-2 secretion, IL-6 and NOS expression in IL-1 or LPS induced PDL cells.

Name of Investigators : Tussanee Yongchaitrakul, Prasit Pavasant

Year : May 2002

Abstract

The purpose of this study is to investigate the responses of periodontal ligament cells after activating with estrogen, IL-1 β or lipopolysaccharides (LPS) alone or activating with the combination of estrogen and IL-1 β or estrogen and LPS. After 24 hours of the activation, the levels of IL-6 and NOS expressions were examined using RT-PCR analysis. The amounts of MMP-1, -2 and -3 in the medium were also measured after 48 hours activation using Western analysis for MMP-1 and zymography for MMP-2 and MMP-3. The results indicated that estrogen alone had no effect on IL-6, NOS, MMP-1 and MMP-2 but could increase MMP-3 secretion at 100 nM concentration. Both IL-1 β and LPS increased the levels of IL-6 and NOS expression and also increased the secretion of MMP-1. Interestingly, when cells were activated with both estrogen and IL-1 β , the levels of IL-6, NOS and MMP-1 increased up to 2.4, 5 and 2.3 folds, respectively, compared with 1.7, 4.2 and 1.3 folds when cells received IL-1 β alone. Similarly, activation with both estrogen and LPS increased the level of NOS and MMP-1 from 2 and 1.9 fold up to 3.7 and 2.9 folds, respectively, in comparing with LPS-treated alone. The results showed that increasing level of estrogen, especially during puberty and pregnancy, could affect the response of PDL cells to pro-inflammatory factors by increasing the enzyme or cytokine release, which consequently enhanced periodontal tissue destruction.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	4
ผลการทดลอง	11
สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง	14
เอกสารอ้างอิง	18
ภาคผนวก	40



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 กราฟแสดงการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี MTT	23
รูปที่ 2 ภาพจาก gelatin zymography แสดงการเปลี่ยนแปลงของ MMP-2 ในเซลล์เอ็นโดทีลียัลที่ถูกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS	25
รูปที่ 3 ภาพจาก Western analysis แสดงการเปลี่ยนแปลงของ MMP-1 ในเซลล์เอ็นโดทีลียัลที่ถูกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS	27
รูปที่ 4 ภาพ PCR product ของ IL-6, NOS-3 และ GAPDH ในเซลล์เอ็นโดทีลียัลที่ถูกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS	29
รูปที่ 5 ภาพจาก casein zymography แสดงการเปลี่ยนแปลงของ MMP-3 ในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol IL-1 β หรือ LPS	31
รูปที่ 6 ภาพจาก gelatin zymography แสดงการเปลี่ยนแปลงของ MMP-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol IL-1 β หรือ LPS	33
รูปที่ 7 กราฟแสดงผลร่วมของ estradiol และ IL-1 β หรือ LPS ที่มีต่อการหลั่ง MMP-1	35
รูปที่ 8 กราฟแสดงผลร่วมของ estradiol และ IL-1 β หรือ LPS ที่มีต่อการแสดงออกของ IL-6	37
รูปที่ 9 กราฟแสดงผลร่วมของ estradiol และ IL-1 β หรือ LPS ที่มีต่อการแสดงออกของ NOS-3	39



บทนำ

โรคปริทันต์เป็นโรคที่เกิดจากการทำลายอย่างเรื้อรังของเนื้อเยื่อปริทันต์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียฟันในที่สุด กลไกหลักที่ก่อให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อนั้น พบว่าเกิดจากการตอบสนองของเซลล์ในเนื้อเยื่อปริทันต์ต่อผลผลิตของแบคทีเรียในร่องลึกปริทันต์ โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต โดยผลผลิตจากแบคทีเรียเหล่านั้นจะกระตุ้นให้เซลล์หลั่ง cytokines ที่เหนี่ยวนำกระบวนการอักเสบ รวมทั้งเอนไซม์ออกมาเป็นจำนวนมาก (Birkedel-Hansen, 1993; DeCarlo et al., 1997) ซึ่งนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์

ความรุนแรงของการตอบสนองของเซลล์ในร่างกายต่อผลผลิตของแบคทีเรียเหล่านั้น นอกจากจะขึ้นกับชนิดและปริมาณของผลผลิตของแบคทีเรียเองแล้ว ระดับของฮอร์โมนหลายชนิดในร่างกาย รวมทั้งฮอร์โมนเพศ จะมีอิทธิพลต่อระดับของความรุนแรงของการอักเสบและการทำลายของเนื้อเยื่อในรอยโรคหลายชนิด (Jansson and Holmdahl, 1998; Nathan and Chaudhuri, 1997) รวมทั้งโรคปริทันต์ มีรายงานว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับของฮอร์โมนเพศ โดยเฉพาะ เอสโตรเจน (estrogen) และโปรเจสเตอโรน (progesterone) ทั้งในกรณีของหญิงมีครรภ์ ผู้ที่ได้รับยาคุมกำเนิด หญิงในวัยหมดประจำเดือน หรือในวัยรุ่น จะพบการเพิ่มขึ้นของคราบจุลินทรีย์ (bacterial plaque) และ cytokines ที่เหนี่ยวนำการอักเสบ รวมทั้งมีอัตราของการเกิดโรคเหงือกอักเสบและโรคปริทันต์เพิ่มมากขึ้น (Loe and Silness, 1963; Hugoson, 1970; Mombelli et al., 1989) ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ระดับของฮอร์โมนเพศกับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคปริทันต์ (Sooriyamoorthy and Gower, 1988)

แม้จะมีหลักฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเอสโตรเจนกับการเพิ่มความไวต่อการเกิดการอักเสบ แต่ผลการศึกษาถึงบทบาทของเอสโตรเจนต่อการหลั่ง cytokines ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในห้องปฏิบัติการ กลับปรากฏว่า เซลล์แต่ละชนิดจะตอบสนองต่อฮอร์โมนตัวนี้แตกต่างกันอย่างมาก ตัวอย่างเช่น เอสโตรเจนสามารถเพิ่มการหลั่งของ interferon (IFN)-gamma ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Fox et al., 1991) รวมทั้งเพิ่มการระดับของ nitric oxide synthase (NOS) ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนู (Weiner et al., 1994; Grohe et al., 1998) และเซลล์กระดูก (osteoblast) ของคน (Armour and Ralston, 1998) แต่ในทางตรงกันข้าม ก็มีรายงานแสดงว่า เอสโตรเจน มีอิทธิพลในการลดการหลั่ง cytokines ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในเซลล์ macrophage (Deshpande et al., 1997) รวมทั้งยับยั้งการ

สร้าง NOS ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด และ microglia ของหนู (Vegeto et al., 2000) ซึ่งผลที่ชัดเจนนี้ ทำให้บทบาทของฮอริโมน เอสโตรเจน ต่อกระบวนการอักเสบยังคงไม่ชัดเจน

สำหรับเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์เอ็นดอทีลียัลปริทันต์นั้น ยังไม่ปรากฏหลักฐานแน่ชัดว่ามีการตอบสนองต่อ เอสโตรเจน ในลักษณะใด และยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเซลล์ต่อผลผลิตของแบคทีเรียหรือต่อ cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ในภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของ เอสโตรเจน

ผลผลิตของแบคทีเรียและ cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งในการก่อให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อ โดยพบว่าผลผลิตของแบคทีเรียโดยเฉพาะไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) สามารถกระตุ้นให้เซลล์ macrophage และ fibroblast หลั่ง cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-1 (interleukin-1; IL-1), Tumor necrosis factor (TNF)-alpha และอินเตอร์ลิวคิน-6 (interleukin-6; IL-6) (Pang et al., 1994; Agarwal et al., 1995; Kent et al., 1998) รวมทั้งกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteinases หรือ MMPs ซึ่งนำไปสู่การทำลายของเนื้อเยื่อ (Gemmell et al., 1997) นอกจากนี้ อิทธิพลของ cytokines โดยเฉพาะ IL-1 ยังเหนี่ยวนำให้เซลล์เพิ่มการสร้างและหลั่ง cytokines ตัวอื่นๆ (Bartold and Heyness, 1991; Tagigawa et al., 1994) เป็นผลให้ระดับความรุนแรงของการอักเสบเพิ่มขึ้น และยังกระตุ้นการสร้างและหลั่งเอนไซม์ MMP (Nakaya et al., 1997; Kossakowska et al., 1999) ซึ่งจะเพิ่มความรุนแรงของการทำลายเนื้อเยื่อมากขึ้นด้วย

ในกรณีของโรคปริทันต์พบว่าเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) ซึ่งเป็นเชื้อกรัมลบที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (gram negative anaerobic bacteria) จัดเป็นเชื้อหลักที่ก่อให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ และมีรายงานว่าผลผลิตของ *P.gingivalis* โดยเฉพาะ LPS สามารถกระตุ้นการหลั่ง cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งชักนำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์ (Matsushita et al., 1999) นอกจากนี้ ผลจากงานวิจัยของคณะผู้วิจัยเอง ก็พบว่าผลผลิตของ *P.gingivalis* ที่เพาะจากร่องลึกปริทันต์สามารถกระตุ้นการหลั่ง MMP-2 จากเซลล์เหงือกและเซลล์เอ็นดอทีลียัลปริทันต์ได้เช่นกัน (Pattamapun et al., 2001) อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ เอสโตรเจนในกระบวนการอักเสบของเนื้อเยื่อปริทันต์โดยเฉพาะในแง่ที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของ *P.gingivalis* ยังมีน้อยมาก ทำให้ความเข้าใจถึงความเสี่ยงของการเกิดโรคปริทันต์ในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงของ

เอสโตรเจน ยังไม่ชัดเจน การศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้ จะช่วยเพิ่มความเข้าใจในกระบวนการเกิดโรคปริทันต์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการรักษาโรคต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษาคั้งนี้คือ

1. ศึกษาผลของเอสโตรเจน ที่มีต่อพฤติกรรมของเซลล์เพาะเลี้ยงจากเอ็นยัดปริทันต์ ในแง่ของการแสดงออกของ IL-6, NOS-3 และการหลั่งเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-2

2 เปรียบเทียบผลของการตอบสนองต่อเซลล์ในข้อ 1 กับการตอบสนองของเซลล์ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-1 β หรือ LPS ของ *P.gingivalis* ร่วมกับเอสโตรเจน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์

เซลล์จากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ ซึ่งต่อไปจะเรียกว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ จะเตรียมจากเนื้อเยื่อบริเวณรากฟันกรามซี่ที่ 3 ของผู้ป่วยที่มาถอนฟันกรามซี่สุดท้ายที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยฟันซี่นั้นๆ ถูกถอนเนื่องจากการจัดฟันหรือเป็นฟันคุดโดยที่ไม่มีการผูกหรือการอักเสบของฟันและเหงือก ฟันจะถูกล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลาเนียม ที่ปราศจากเชื้อหลายๆ ครั้ง 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) เพนิซิลลิน 100 ยูนิต/มิลลิลิตร (100 IU/ml penicillin) สเตรปโตมัยซินซัลเฟต 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (100 µg/ml streptomycin sulfate) และแอมโฟเทอริซินบี 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (0.25 µg/ml amphotericin B)

ชิ้นเนื้อจะถูกเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์เริ่มคลานออกจากชิ้นเนื้อ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน เซลล์จะเจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ภายใน 2 สัปดาห์ จากนั้นจะถูกถ่ายลงจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ การขยายจำนวนเซลล์จะทำโดยการถ่าย (subculture) เซลล์ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ในอัตราส่วน 1:3 โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA, GibcoBRL, NY, USA) และเริ่มนับเซลล์ที่หว่านใหม่นี้เป็นเซลล์รุ่นที่ 1 เซลล์จะถูกถ่ายสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในแต่ละการทดลองต่อไปนี้จะใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วยอย่างน้อย 3 คน โดยใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-4

การเพาะเลี้ยง *P. gingivalis*

แบคทีเรียสายพันธุ์ *P. gingivalis* (ATCC 53978) ถูกเลี้ยงบน blood agar plate ที่มี hemin 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร vitamin K1 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และกานามัยซินซัลเฟต (Kanamycin sulfate) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเลี้ยงใน anaerobic Jar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใช้ GasPak™ (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) ในการ

ปรับสภาวะ anaerobic condition เมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลาประมาณ 3 วัน จึงทำการแยกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีดำ ลักษณะครึ่งทรงกลมคว่ำ ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ไปเพาะเลี้ยงใน Tryptic soy broth (TSB) ที่เติม hemin และ vitamin K ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ใน anaerobic jar เช่นเดียวกับข้างต้น เมื่อเลี้ยงเชื้อใน TSB ไปประมาณ 3 วัน หรือจนกระทั่งได้ความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ OD 600 เท่ากับ 0.6-0.7 จากนั้นจึงนำไปสกัด LPS

การสกัด LPS (หรือ endotoxin) จากแบคทีเรีย

วิธีการสกัด LPS ทำตามวิธีที่รายงานไว้โดย Al-Hendy และคณะ (1991) โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ แบคทีเรียถูกเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 3 วัน หรือจนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.6-0.7 จากนั้นจึงถ่ายแบคทีเรียที่เลี้ยงได้ลงในหลอด หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 16,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อจะถูกดูดทิ้ง แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วย TAE buffer (40mM Tris-acetate, pH 8.5, 2mM EDTA) 100 ไมโครลิตรและ alkaline solution (3 gm SDS, 0.6 g Tris, 6.4 ml ของ 2N NaOH ใน 100 ml ของน้ำ) 200 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 70 นาที

เมื่อครบเวลาการบ่ม เติม preheated phenol- chloroform 300 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลอด และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อีก 15 นาที ก่อนนำไปปั่นที่ความเร็ว 16,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ส่วนของ aqueous phase ตอนบนถูกเก็บและนำมาย่อยด้วย proteinase K (60 ไมโครกรัม/หลอด) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อีก 60 นาที

ภายหลังการย่อย เติมน้ำ 200 ไมโครลิตร และสารละลาย sodium acetate pH 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมอัลกอฮอล์ในปริมาณ 2 เท่าของสารละลายที่ได้ในแต่ละหลอด และบ่มบนน้ำแข็งประมาณ 30 นาที ก่อนที่จะนำไปปั่นที่ 16,000 rpm อีก 10 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ในปริมาณ 200 ไมโครลิตร/หลอด เติมอัลกอฮอล์ 400 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลอด และบ่มบนน้ำแข็งอีก 30 นาที ก่อนนำไปปั่นที่ความเร็ว 16,000 rpm อีก 10 นาที ตะกอนที่ได้ในแต่ละหลอด จะถูกละลายในน้ำ 50 ไมโครลิตร และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

ปริมาณของ LPS หรือเอนโดทอกซิน (Endotoxin) ที่เตรียมได้ จะถูกวัดด้วยชุดวัด E-TOXATE (Sigma, USA) โดยเทียบกับค่ามาตรฐานของเอนโดทอกซินที่ได้จาก *Escherichia coli* (*E. coli*) 0.55:B5 lipopolysaccharide (4000 Endotoxin unit/ vial) จากนั้นปรับค่าของ LPS ที่เตรียมได้เป็น 1 Endotoxin unit (EU)/มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ LPS โดยการย้อมด้วย silver stain

การย้อม silver แบบ nondiamine ทำตามวิธีของ Merrill และคณะ (1994) โดยนำ LPS มาแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ gel ที่มี acrylamide ความเข้มข้นร้อยละ 14 โดยผสม LPS ใน sample buffer ที่ประกอบด้วย Tris-HCl pH 6.8 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ SDS ความเข้มข้นร้อยละ 2 ซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 20 mercaptoethanol ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ bromophenol blue ความเข้มข้นร้อยละ 0.001 เมื่อแยกด้วยไฟฟ้าเสร็จสิ้นแล้ว นำแผ่น gel ที่ได้มาตรึง (fixation) ในสารละลาย methanol ความเข้มข้นร้อยละ 50 (v/v) และ acetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 10 (v/v) เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง (หรืออาจแช่ได้นานข้ามคืนได้) จากนั้น แช่ในสารละลายของ methanol ความเข้มข้นร้อยละ 10 (v/v) และ acetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 5 (v/v) อีก 10 นาที

จากนั้น แช่แผ่น gel ในสารละลาย glutaraldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 2 (v/v) นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดชนิดที่ปราศจากอิออน นาน 15 นาที ก่อนนำไปแช่ในสารละลายของ potassium dichromate ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) อีก 5 นาที ในขั้นสุดท้ายจึงย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (w/v) นาน 25 นาที

หลังการย้อม แช่แผ่น gel ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate 0.283 M และ formaldehyde 0.007 M) จนกระทั่งเริ่มสังเกตเห็นแถบสีน้ำตาล-ดำปรากฏ (ประมาณ 1-3 นาที) แล้วย้ายไปแช่ในสารละลาย acetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 3 (v/v) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาการเกิดสี ก่อนนำมาล้างด้วยน้ำสะอาดชนิดที่ปราศจากอิออนอีก 2 รอบ ๆ ละ 10 นาที

การกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol, IL-1 β และ LPS

เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ ที่ความหนาแน่น 25,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 1 วัน ในวันรุ่งขึ้นอาหารเลี้ยงเซลล์ถูกเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติม artificial serum ซึ่งประกอบด้วย

สารต่อไปนี้เป็นคือ insulin-transferin-selenium (ITS), sodium pyruvate, non-essential amino acid, vitamin mixture และ bovine serum albumin (Gibco, NY, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol (17beta-estradiol, Sigma, St. Louis, MO, USA) IL-1 β (rat, recombinant expressed in *E. coli*) (Sigma, St. Louis, MO, USA) หรือ LPS ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน และเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับการทดสอบความเป็นพิษ และการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ mRNA ของ IL-6 และ NOS ด้วยวิธี RT-PCR ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-2 ที่หลังจากเซลล์จะถูกตรวจสอบหลังการกระตุ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยวิธี western analysis และ zymography ตามลำดับ ระดับของ estrogen, IL-1 β และ LPS ที่ให้ผลที่ชัดเจนที่สุดจะถูกนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ในการทดลองขั้นต่อไป เป็นการกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol ร่วมกับ IL-1 β หรือ estradiol ร่วมกับ LPS โดยใช้ความเข้มข้นที่ให้ผลการตอบสนองชัดเจนที่สุดจากการทดลองข้างต้น (estradiol 100 ไมโครโมลาร์, IL-1 β 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ LPS 16 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ IL-6 และ NOS ในเวลา 24 ชั่วโมง และ MMP-1 และ MMP-2 ในเวลา 48 ชั่วโมงด้วยวิธีเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น

การวัดความเป็นพิษด้วยเทคนิค MTT assay

ความเป็นพิษของสารที่ใช้ในการทดสอบ คือ estradiol, IL-1 และ LPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะวัดโดย MTT assay ตามวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว (Charoonpatrapong and Pattamapun, 2000) โดยเซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 25,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 1 วัน ในวันรุ่งขึ้นอาหารเลี้ยงเซลล์ถูกเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติม artificial serum จากนั้นเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย สารที่ใช้ในการทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใน 4 ชั่วโมงสุดท้ายของการกระตุ้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มี phenol red และมี MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติม DMSO (dimethylsulfoxide) 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึก formazan ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลาย

MTT จากนั้นจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นจะแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นจำนวนเซลล์ตามกราฟมาตรฐาน และปรับเป็นจำนวนร้อยละของเซลล์

การวิเคราะห์เอนไซม์ MMP-2 หรือ MMP-3 ด้วยวิธี Zymography

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาเอนไซม์ MMP-2 หรือ MMP-3 ตามวิธีที่เคยรายงานไว้แล้ว (Pattamapun et al., 2001; Dhanesuan, 1998) ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกผสมกับ Laemmli buffer (Laemmli, 1970) แล้วนำไปแยกด้วยไฟฟ้าใน acrylamide gel ที่มีความเข้มข้นของ acrylamide ร้อยละ 10 และมีส่วนผสมของ gelatin ในปริมาณ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือมีส่วนผสมของ beta casein ในความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย gelatin และ beta casein จะเป็น substrate สำหรับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-3 ตามลำดับ และปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้จะเปรียบเทียบต่อปริมาณเซลล์ที่เท่ากัน

เมื่อเสร็จสิ้นการแยกด้วยไฟฟ้าแล้ว ล้างเจลด้วยสารละลาย TritonX-100 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 สามรอบ รอบละ 10 นาที ก่อนนำไปบ่มด้วยสารละลาย developing buffer (0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl pH7.5, 0.1% Brij35) เป็นเวลา 1 คืนสำหรับ MMP-2 และเป็นเวลา 2 คืนสำหรับ MMP-3 ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงย้อมด้วย Coomassie Blue R250 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) และกรดอะซิติก (acetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 40 และร้อยละ 7 ตามลำดับ ล้างด้วย low methanol destain (5% methanol, 7.5% acetic acid) บริเวณที่มีเอนไซม์ MMP-2 หรือ MMP-3 จะปรากฏเป็นแถบใสบนเจลสีน้ำเงิน

การวิเคราะห์ปริมาณ MMP-1 ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ Western และ auto-fluorography

อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยการนำไปปั่นด้วย Nanosep ที่สามารถแยกโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตันออกไปได้ โดยปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10-15 เท่า แล้วนำไปแยกด้วยไฟฟ้าใน 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 จะถูกตรวจสอบด้วยวิธี auto-fluorography โดยการเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้ว ด้วยชุดขยายสัญญาณแบบเคมี (Renaissance[®] Chemiluminescence, NEN[™] Life Science, USA) จากนั้นจึงตรวจจับสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ (CL-Xposure[™] Film, Pierce, Rockford, IL, USA)

การวิเคราะห์ระดับของอาร์เอ็นเอในรหัสด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR)

อาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์จะถูกสกัดด้วย TRIzol (Gibco, NY, USA) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต อาร์เอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปผ่านกระบวนการ reverse transcription ด้วยเอนไซม์ AMV (Avian myeloblastosis virus) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) และ oligodT primer (Promega, Madison, WI, USA) เพื่อสังเคราะห์ cDNA ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

cDNA ที่ได้จะถูกนำไปเพิ่มจำนวนด้วยกระบวนการ PCR โดยใช้เครื่อง ThermoHybaid (Ashford, UK) การเพิ่มจำนวนจะทำโดยการใช้สาย primer ที่จำเพาะต่อ IL-6, NOS-3 และ GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) ควบคู่กันไป เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (internal control) ของการทดลอง Primers ต่อ human IL-6, NOS-3 และ GAPDH ถูกออกแบบจากลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank ลำดับของนิวคลีโอไทด์ ของ primers ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ

IL-6:	sense	5' CCTGAACCTTCCAAAGATGGC 3'	(GI: 11420173)
	antisense	5' CTGACCAGAAGAAGGAATGCC 3'	
NOS-3:	sense	5' CTACAATCCGCTCAGTGGAAA 3'	(GI: 10835160)
	antisense	5' CCGAGCTGACTGAGTAGTAC 3'	
GAPDH:	sense	5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT 3'	(GI: 4503912)
	antisense	5' TCACACCCATGACGAACATGG 3'	

โดยตั้งระดับของอุณหภูมิในการเพิ่มจำนวนดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 ครั้ง ตามด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 45 วินาที อีก 28 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที อีก 1 รอบ และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว สายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน agarose gel ที่มีความเข้มข้นของ agarose ร้อยละ 2 และถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพลาไรด์ (polaroid) บนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษของ estradiol, IL-1 β และ LPS ที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์

รูปที่ 1 แสดงถึงผลของสารในความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ในการกระตุ้น ต่อจำนวนเซลล์ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า estradiol ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อจำนวนเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 1,000 ไมโครโมลาร์ แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ estradiol ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ในการทดลองขั้นต่อไป

สำหรับ IL-1 β และ LPS พบว่า IL-1 β ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ LPS ที่ความเข้มข้น 0-16 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลของ estradiol, IL-1 β และ LPS ต่อการหลั่งเอนไซม์ MMP-2

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยไซโมกราฟี เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol, IL-1 β และ LPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ทั้ง estradiol และ IL-1 β ไม่มีผลในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์จาก latent form (72 kD) เป็น active form (62 kD) ในขณะที่การกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยการเปลี่ยน latent form ของเอนไซม์ ให้กลายเป็น active form ผลของการกระตุ้นนี้ จะเกิดในลักษณะที่แปรผันกับความเข้มข้นของ LPS (dose dependent) โดยเริ่มเห็นการกระตุ้นได้ชัดที่ความเข้มข้น 8 และ 16 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร (รูปที่ 2)

ผลต่อการหลั่งเอนไซม์ MMP-1

ปริมาณของ MMP-1 ที่เซลล์หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ จะถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western analysis ดังแสดงผลในรูปที่ 3 ผลการทดลองแสดงว่า การกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ (คือ 1, 10, 100 ไมโครโมลาร์) ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณของ MMP-1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่การกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-1 β และ LPS สามารถกระตุ้นการหลั่ง MMP-1 ได้ โดยพบว่า IL-1 β และ LPS สามารถกระตุ้นการหลั่ง MMP-1 ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และที่ 8 และ 16 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ของ IL-1 β และ LPS ตามลำดับ โปรตีน MMP-1 ที่ปรากฏเป็น 2 แถบ เป็น

doublet ของ proMMP-1 ซึ่งมีรายงานว่าสามารถพบ doublet ได้ในเซลล์สร้างเส้นใย (Stricklin et al,1977)

การแสดงออกของ IL-6 และ NOS-3

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ IL-6 และ NOS-3 จากการกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β และ LPS แสดงผลไว้ในรูปที่ 4 โดยใช้เทคนิค RT-PCR ในการวิเคราะห์ ผลการทดลองแสดงว่า estradiol ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ IL-6 และ NOS-3 ในขณะที่ทั้ง IL-1 β และ LPS สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ NOS-3 แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ IL-6 ผลการทดลองนี้ จะใช้การแสดงออกของ GAPDH เป็นกลุ่มควบคุมภายใน

ผลในการกระตุ้นการหลั่ง MMP-3

เพื่อเป็นการตรวจสอบการตอบสนองของเซลล์เอ็นดอทีลียัลที่มีต่อ estradiol คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ MMP-3 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี casein zymography หลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol ที่ความเข้มข้น 0, 1 10 และ 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองในรูปที่ 5 A พบว่า estradiol ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มีผลต่อเซลล์ในการกระตุ้นการหลั่ง MMP-3 อย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เซลล์เอ็นดอทีลียัลสามารถตอบสนองต่อ estradiol ได้

เมื่อทำการทดสอบผลของ IL-1 β และ LPS ที่มีต่อการหลั่ง MMP-3 ในสภาวะที่มีหรือไม่มี estradiol ร่วมด้วย ผลการทดลองในรูปที่ 5 B และ C แสดงว่า LPS ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการหลั่ง MMP-3 ในขณะที่ IL-1 β ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีผลต่อ MMP-3 อย่างไรก็ดี เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-1 β และ LPS ร่วมกับ estradiol จะไม่แสดงผลต่างจากการกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS เพียงชนิดเดียว

การเปลี่ยนแปลงของ MMP-1, MMP-2, IL-6 และ NOS-3 ในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย estradiol ร่วมกับ IL-1 β หรือ LPS

จากผลการทดลองในรูปที่ 5 ซึ่งแสดงการตอบสนองของเซลล์เอ็นดอทีลียัลต่อ estradiol ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ดังนั้น คณะผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้นดังกล่าวมาใช้ในการทดลองในขั้น

ต่อไป เมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol ร่วมกับ IL-1 β (10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) หรือ LPS (8 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร)

ผลการทดลองในรูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ MMP-2 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gelatin zymography โดยจะพบว่า LPS เป็นสารกระตุ้นเพียงชนิดเดียวที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยเปลี่ยน MMP-2 จาก latent form เป็น active form ในขณะที่การกระตุ้นด้วย IL-1 β หรือ estradiol ไม่มีผลต่อ MMP-2 และเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย IL-1 β หรือ LPS ในสภาวะที่มี estradiol ร่วมด้วย จะให้ผลไม่ต่างจากการกระตุ้นด้วย IL-1 β หรือ LPS เพียงอย่างเดียว

ส่วนในกรณีของ MMP-1 เมื่อทำการตรวจสอบความเข้มของแถบสีที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western analysis โดยอ่านค่าความเข้มด้วย densitometer (Imaging densitometer GS-700, BioRad, Hercules, CA, USA) และแสดงค่าเปรียบเทียบเป็นกราฟแท่งในรูปที่ 7 ผลการทดลองแสดงว่า มีการเสริมฤทธิ์ระหว่าง estradiol กับ IL-1 β และ LPS ในการเพิ่มการหลั่ง MMP-1 โดยพบว่า การกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol เองไม่มีผลในการกระตุ้นการหลั่ง MMP-1 ในขณะที่ IL-1 β และ LPS สามารถเพิ่มการหลั่ง MMP-1 เป็น 1.3 และ 1.9 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และในสภาวะที่กระตุ้นด้วย estradiol ร่วมกับ IL-1 β หรือ LPS ระดับของการหลั่ง MMP-1 เพิ่มขึ้นเป็น 2.3 และ 2.9 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูป 7A และ B)

ในทำนองเดียวกัน เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของ IL-6 และ NOS-3 ด้วยเทคนิค RT-PCR และอ่านความเข้มด้วย densitometer จากนั้นจึงปรับค่าความเข้มเมื่อเทียบกับความเข้มของ GAPDH ที่เท่ากัน ผลปรากฏว่า estradiol ซึ่งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ IL-6 สามารถเสริมผลของ IL-1 β ในการเพิ่ม IL-6 ให้ชัดเจนขึ้นจาก 1.7 เท่าเป็น 2.4 เท่า (รูป 8A) ส่วนการกระตุ้นด้วย LPS ทั้งในภาวะที่มีและไม่มี estrogen ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ IL-6 ในการทดลองนี้ (รูป 8B)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของ NOS-3 นั้น พบว่าโดยลำพัง IL-1 β หรือ LPS สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ NOS-3 ได้ (4.2 และ 2 เท่า ตามลำดับ) ในขณะที่ estradiol เองไม่สามารถกระตุ้น NOS-3 ได้ แต่เมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol และ IL-1 β หรือ LPS ปรากฏว่า estradiol สามารถเสริมฤทธิ์การกระตุ้น NOS-3 ของ IL-1 β และ LPS ให้เพิ่มเป็น 5 และ 3.7 เท่าตามลำดับ (รูป 9 A และ B)



สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดลองในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยพบว่า เซลล์เอ็นดีปรีทนต์สามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ estradiol ในห้องปฏิบัติการได้ โดยพบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีผลกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ MMP-3 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนในเมทริกซ์นอกเซลล์ อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-1 ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยคอลลาเจน ซึ่งแสดงว่า estradiol อาจมีบทบาทต่อการปรับเปลี่ยนหรือย่อยสลายโปรตีนอื่นบางชนิดในเมทริกซ์นอกเซลล์

บทบาทของ estradiol ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของ MMP นั้น ยังพบได้ในเซลล์ชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น รายงานของ Ardans และคณะ (Ardans et al, 2001) ที่แสดงว่า estradiol สามารถเพิ่มการหลั่งเอนไซม์ MMP-1 ในเซลล์ monocytes ซึ่งสนับสนุนว่า estradiol น่าจะมีบทบาทในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเมทริกซ์นอกเซลล์ ผ่านเซลล์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ซึ่งหลักฐานสนับสนุนแนวคิดนี้ ยังได้จากผลการทดลอง ของ Morishita และคณะ ที่รายงานว่า เซลล์เอ็นดีปรีทนต์สามารถตอบสนองต่อเอสโตรเจนโดยการสร้าง osteocalcin (Morishita et al., 1998) และเกิด mineralized bone nodule (Morishita et al., 1999b) ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสะท้อนถึงบทบาทของ estradiol ในแง่ของการปรับเปลี่ยนสมดุลของเนื้อเยื่ออินทรีย์เช่น กระดูก ในร่างกายด้วย

ผลของ estradiol ที่ได้ในการทดลองครั้งนี้ สนับสนุนรายงานที่แสดงว่า เซลล์เอ็นดีปรีทนต์ มี estrogen receptor ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม ปริมาณของ estrogen receptor จะค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์กระดูก (Morishita et al., 1999a) ซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลหนึ่งที่สนับสนุนว่า เซลล์เอ็นดีปรีทนต์ไม่ไวต่อการกระตุ้นของเอสโตรเจน เท่ากับเซลล์กระดูก

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเมทริกซ์นอกเซลล์ อาจเกิดผ่านสมดุลของการสร้างและหลั่งสารในกลุ่ม cytokines ได้ด้วย โดยมีรายงานว่า estradiol สามารถกระตุ้นการหลั่ง cytokines ในกลุ่ม IL-6 ในเซลล์ synoviocytes (Kawasaki et al, 2000) และ chondrocytes (Gueme et al, 1990) แต่ต้องอยู่ในภาวะที่มี IL-1 ร่วมด้วย ผลการทดลองของคณะผู้วิจัยในครั้งนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ ระดับ mRNA ของ NOS-3 และ IL-6 เมื่อกระตุ้นด้วยเอสโตรเจนเพียงอย่างเดียว ไม่ว่าความเข้มข้นของ estrogen ที่ใช้นั้นจะอยู่ในช่วงของ physiological dose (10^{-8} M- 10^{-6} M) หรือมากกว่า physiological dose ก็ตาม ผลดังกล่าวนี้ สะท้อนว่าเซลล์เอ็นดีปรีทนต์เองน่าจะไม่ใช่เซลล์หลักในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลง

ของ estradiol โดยตรง แต่อาจมีการตอบสนองเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสมดุลของปัจจัยแวดล้อมของเนื้อเยื่อ

อย่างไรก็ดี การเปลี่ยนแปลงของ MMP-1 และ MMP-2 รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของ IL-6 และ NOS-3 นั้น เป็นปรากฏการณ์ที่พบในรอยโรคปริทันต์ และสะท้อนถึงระดับของการทำลายเนื้อเยื่อในรอยโรคปริทันต์ โดยมีรายงานว่า เชื้อที่เป็นสาเหตุหลักของโรคปริทันต์ คือ *P.gingivalis* ซึ่งเป็น anaerobic bacteria สามารถหลั่ง virulence factors โดยเฉพาะ LPS ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ของผู้ป่วยเองสร้างและหลั่ง MMP และ inflammatory cytokines ออกมาจำนวนมาก เช่น IL-1 β และ IL-6 รวมทั้งเพิ่มระดับของ nitric oxide ในเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มระดับของ NOS ในเซลล์หลายชนิด และผลของ LPS ดังกล่าวนี้อาจเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดอาการอักเสบและการทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์อย่างเรื้อรัง (Matsushita et al, 1999; Wassenaar et al, 1999; Kendall et al, 2000)

เพื่อเป็นการศึกษาเพิ่มเติมถึงบทบาทของ estradiol ในกลไกของการเกิดโรคปริทันต์ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการตอบสนองของเซลล์เอ็นโดทีเลียล ต่อ LPS จากเชื้อ *P.gingivalis* และ IL-1 β ซึ่งเป็น cytokine หลักที่เป็นตัวกระตุ้นกระบวนการอักเสบและการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ ในสภาวะที่มีหรือไม่มี การกระตุ้นจาก estradiol ร่วมด้วย ผลการศึกษา พบว่า ทั้ง LPS และ IL-1 β กระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ NOS-3 และ MMP-1 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว (Kendall et al, 2000) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่า LPS จากเชื้อ *P.gingivalis* สามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 จาก latent form ให้เป็น active form ด้วย

บทบาทของ LPS ในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์เอ็นโดทีเลียลนี้ สอดคล้องกับ รายงานของ Tervahartiala และคณะที่แสดงว่าระดับของ active MMP-2 จะเพิ่มสูงขึ้นมากในเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์ (Tervahartiala et al, 2000) กลไกการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 นั้นค่อนข้างจะซับซ้อนกว่าการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถกระตุ้นได้ด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease เช่น plasminogen/plasmin ที่พบได้ใน plasma โดยการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 จะต้องอาศัยเอนไซม์ในกลุ่ม MT-MMP (membrane type MMP) และสมดุลของ TIMP-2 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2) ที่เหมาะสม นอกจากนี้ ยังมีรายงานที่แสดงว่า ระดับของ MMP-2 โดยเฉพาะ active form จะเป็นกลไกที่สำคัญในการทำลายของเนื้อเยื่อ

(Amies and Quigley, 1995; Reynolds, 1996) กลไกการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดย LPS นั้น ยังคงไม่มีความชัดเจน และต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ผลของการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS และ IL-1 β ในสถานะที่มี estradiol ร่วมด้วย ให้ผลที่น่าสนใจ โดยพบว่า แม้ว่าเซลล์เอ็นโดทีลียัลจะไม่ตอบสนองโดยตรงต่อ estrogen ในแง่ของ cytokines และ MMP-1 แต่เซลล์กลับมีการตอบสนองมากขึ้นต่อ LPS และ IL-1 β ในภาวะที่มี estrogen ร่วมด้วย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Akoum และคณะ (Akoum et al, 2001) ที่แสดงไว้ว่า estrogen ช่วยเสริมฤทธิ์ของ IL-1 ในการเพิ่มการสร้าง IL-8 ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากเยื่อบุมดลูก (endometrial cells) นอกจากนี้ ยังช่วยให้ monocytes สร้าง TNF- α และ IL-1 β ในการตอบสนองต่อ endotoxin เพิ่มขึ้นด้วย (Bouman et al, 2001) อย่างไรก็ตาม ก็มีรายงานว่า estrogen สามารถลดการทำลายเนื้อเยื่อ โดยลดการหลั่ง MMP-1 ในเซลล์กระดูก (Liao and Luo, 2001) โดยผลการทดลองนี้ สนับสนุนแนวคิดที่ว่า estrogen อาจมีบทบาทเกี่ยวกับกระบวนการอักเสบโดยทางอ้อม โดยมีผลส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของ inflammatory cytokines และทำให้ระดับความรุนแรงของการทำลายเนื้อเยื่อเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ ยังสะท้อนให้เห็นว่า แม้เซลล์เอ็นโดทีลียัลจะไม่ใช่เซลล์หลักในการรับรู้และตอบสนองต่อ estrogen แต่เซลล์ในกลุ่มนี้ น่าจะมีบทบาทสำคัญในการกำหนดความรุนแรงของการทำลายของเนื้อเยื่อด้วย นอกเหนือจากเซลล์ในกลุ่มของเม็ดเลือดขาว

กลไกการทำงานของ estrogen นั้น จะเกิดผ่าน estrogen receptor (ER) โดย estrogen จะสามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปจับกับ ER ซึ่งเป็น nuclear receptor ที่สามารถผ่านเข้าสู่นิวเคลียส และมีผลต่อการเปิดหรือปิดการแสดงออกของ gene บางตัวได้ อย่างไรก็ตาม ก็มีรายงานแสดงว่า ผลของ estrogen อาจจะเกิดขึ้นในแบบ nongenomic ได้ คือสัญญาณจาก estrogen จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ secondary messenger เช่น แคลเซียมไอออนในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (Guo et al, 2002) บทบาทการทำงานของ estrogen ในเซลล์แต่ละชนิดยังคงไม่มีความชัดเจน และต้องการการศึกษาเพิ่มเติม อย่างไรก็ตาม การที่ estrogen สามารถทำงานเสริมฤทธิ์ กับสารอื่นๆ ได้นั้น ส่วนหนึ่งน่าจะมาจากการทำงานของ ER ที่สามารถมีอิทธิพลหรือ cross talk กับ nuclear factor กลุ่มอื่นๆ ได้ เช่น ผลของการกระตุ้นการทำงานของ ER ต่อการควบคุมการทำงานของ nuclear factor-kappaB ในเซลล์ตับของคน HepG2 (Harnish et al, 2000) หรือบทบาทของ ER ในการเสริมการทำงานของ IL-1 β promoter ในเซลล์ macrophage (Ruh et al, 1998) การศึกษาเพิ่มเติมถึง cross talk ระหว่างการทำงานของ ES และ

proinflammatory transcription factor ชนิดต่างๆ ในเซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์ น่าจะเป็นอีกคำตอบหนึ่งที่จะช่วยให้เรามีความเข้าใจกลไกการเกิดโรค และการป้องกันการทำลาย หรือลดระดับความรุนแรงของการทำลายเนื้อเยื่อได้ดียิ่งขึ้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Agarwal S, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, Chandra CS. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 β . *J Periodontal Res* 1995;30:382-9.
- 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.
- Al-Hendy A, Toivanen P, Skurnik M. Rapid method for isolation and staining of bacterial lipopolysaccharide. *Microbiol Immunol* 1991;35:331-3.
- Amies RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. *J Biol Chem* 1995;270:5872-6.
- Ardans JA, Blum A, Mangan PR, Wientroub S, Cannon RO 3rd, Wahl LM. Raloxifene-mediated increase in matrix metalloproteinase-1 production by activated monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1265-8.
- Armour KE, Ralston SH. Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblastic-like cells. *Endocrinology* 1998;139:799-802.
- Bartold PM, Haynes DR. Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 1991;26:339-45.
- Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64:474-84.
- 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.
- 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.
- Dhanasuan 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;21:147-155.
- 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.
- Deshpande R, Khalili H, Pergolizzi RG, Michael SD, Chang MD. Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NF κ B activation in murine macrophages. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:46-54.

- Fox HS, Bond BL, Parslow TG. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J Immunol* 1991;146:4362-7.
- Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000* 1997;14:112-43.
- Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Vetter H. Expression of oestrogen receptor α and β in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol* 1998;156:1-7.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hugoson A. Gingival inflammation and female sex hormones. *J Periodontal Res (suppl)* 1970;5:1-18.
- Jansson L, Holmdahl R. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. *Inflamm Res* 1998;47:290-301.
- 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.
- Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao Y, Bartold PM. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 2000;35:194-200.
- Kent LW, Rahemtulla F, Hockett Jr RD, Gilleland RC, Michalek SM. Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblasts. *Infect and Immunity* 1998;66:608-14.
- Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ, Grogan T, Marquez LA, Janowska-Wieczorek A. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1999;94:2080-9.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- 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.

- Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy (I). Prevalence and severity. *Acta Odontologica Scandinavica* 1963;21:533-51.
- Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaokas 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.
- Merril CR, Joy JE, Creed J. Ultrasensitive silver-based stains for protein detection. In *Cell biology: A laboratory handbook*. Vol 3. Editor: Celis J.E. 1994:281-7.
- 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.
- Morishita M, Yamamura T, Bachchu MAH, Shimazu A, Iwamoto Y. The effects of estrogen on osteocalcin production by human periodontal ligament cells. *Archs Oral Biol* 1998;43:329-33.
- 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* 1999a;44:781-3.
- Morishita M, Yamamura T, Shimazu A, Bachchu AH, Iwamoto Y. Estradiol enhances the production of mineralized nodules by human periodontal ligament cells. *J Clin Periodontol* 1999b;26:748-51.
- Nakagawa S, Fujii H, Machida Y, Okuda K. A longitudinal study from prepuberty to puberty of gingivitis. Correlation between the occurrence of *Prevotella intermedia* and sex hormones. *J Clin Periodontol* 1994;21:658-65.
- 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.
- Nathan L, Chaudhuri G. Estrogen and arterosclerosis. *Annu Rev Pharmacol* 1997;37:477-515.
- Pang G, Couch L, Batey R, Clancy R, Cripps A. GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 α , and TNF- α . *Clin Exp Immunol* 1994;96:437-43.
- Pattamapun K, Tunglong T, Osathanon T, Liwchulaschan W, Kuwatanasuchat J, Darongsuwan T, Pavasant P. Activation of MMP-2 by bacterial supenate cultivated from periodontal pockets. *CU Dent J* 2001;24:1-12.
- Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis* 1996;2:70-6.
- 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.
- Sooriyaamoorthy M, Gower DB. Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1989;16:201-8.

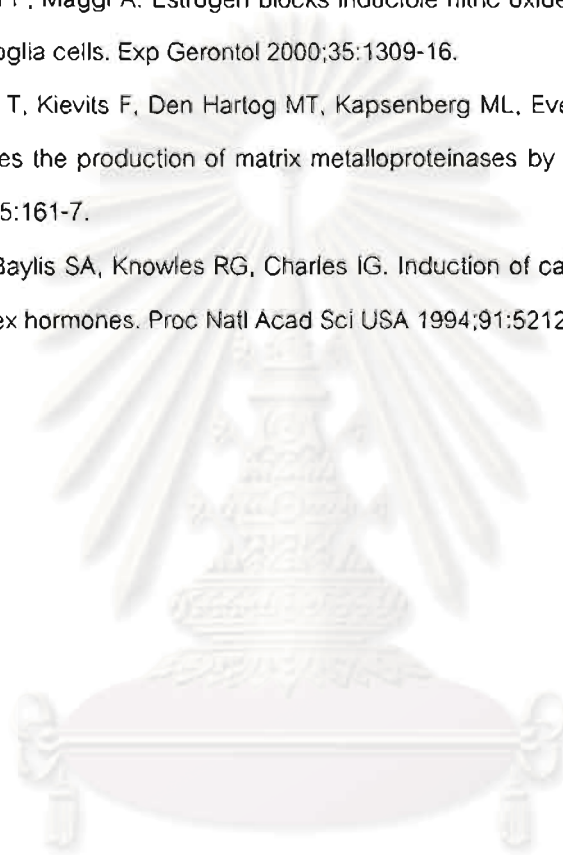
Takigawa M, Takashiba S, Takahashi K, Arai H, Kurihara H, Murayama Y. Prostaglandin E₂ inhibits interleukin-6 release but not its transcription in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 β or tumor necrosis factor- α . J Periodontol 1994;65:1122-7.

Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, Kallio P, Tornwall J, Srinivas R, Kontinen YT, Sorsa T. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2,-8,-13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. J Dent Res 2000;79:1969-77.

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.

Wassenaar A, Verschoor T, Kievits F, Den Hartog MT, Kapsenberg ML, Everts V, Srijders A. CD40 engagement modulates the production of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. Clin Exp Immunol 1999;115:161-7.

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG. Induction of calcium-independent nitric oxide synthases by sex hormones. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:5212-6.

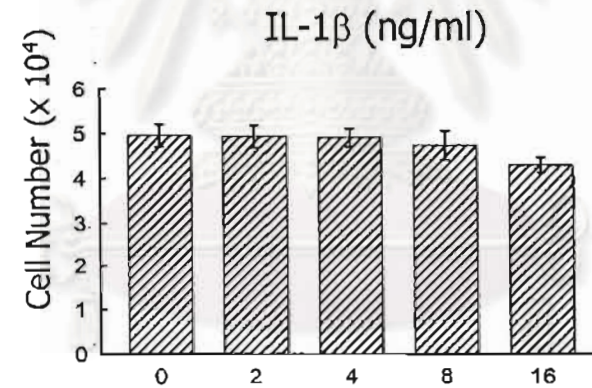
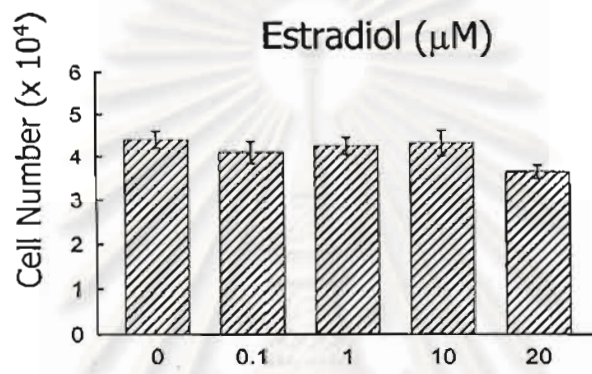
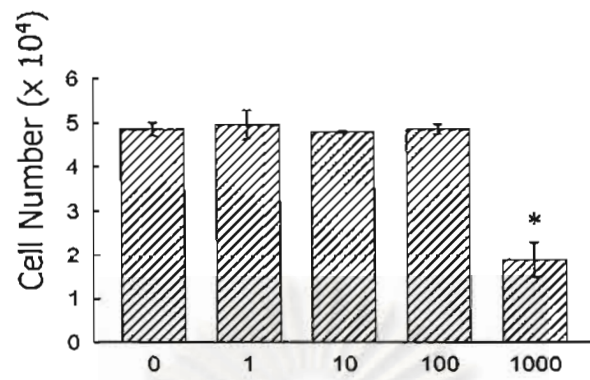


สถาบันวิทยุบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 กราฟแสดงการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี MTT

จำนวนเซลล์เอ็นโดพริคท์ที่มีชีวิตหลังถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อทดสอบด้วย one way ANOVA)

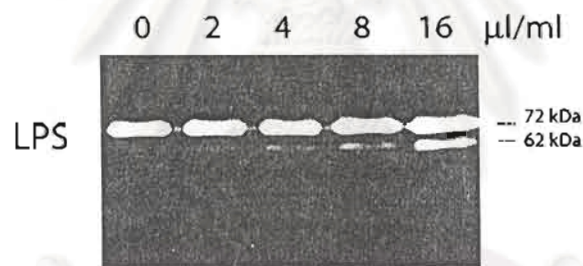
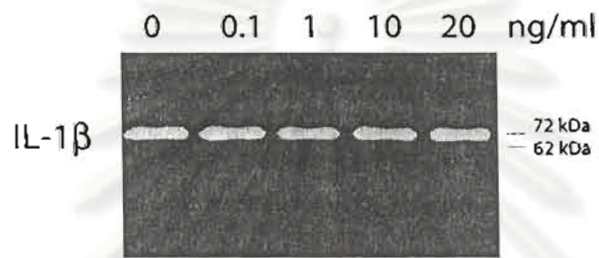
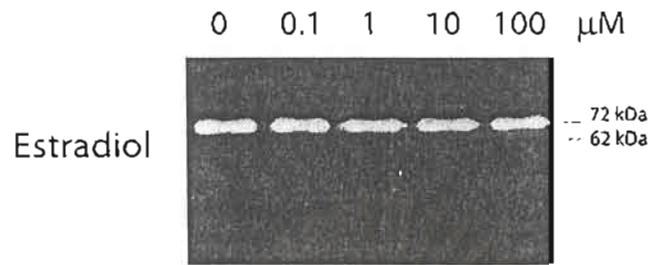
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 ภาพจาก gelatin zymography แสดงการเปลี่ยนแปลงของ MMP-2 ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลที่ถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS

หลังเซลล์เอ็นดอทีลียัลถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงวิเคราะห์ระดับของ MMP-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย gelatin zymography MMP-2 ในรูปของ latent MMP-2 มีขนาด 72 kDa ส่วน MMP-2 ที่สามารถทำงานได้ (active MMP-2) จะมีขนาด 62 kDa

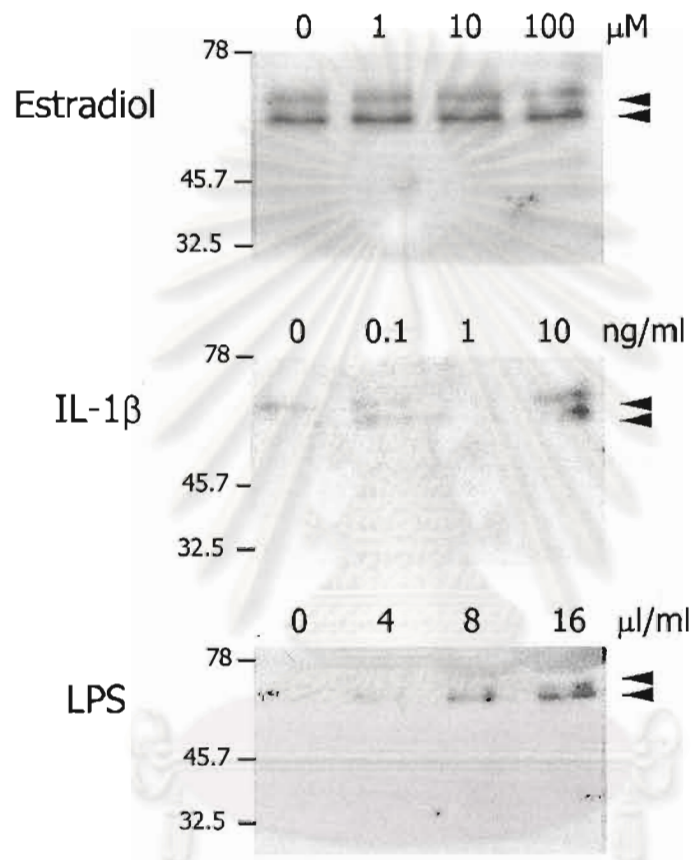


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 ภาพจาก Western analysis แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับ หรือปริมาณของ MMP-1 ในเซลล์เอ็นโดพริทนต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS

เอ็นโดพริทนต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ระดับของ MMP-1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ถูกวิเคราะห์ด้วย Western analysis

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

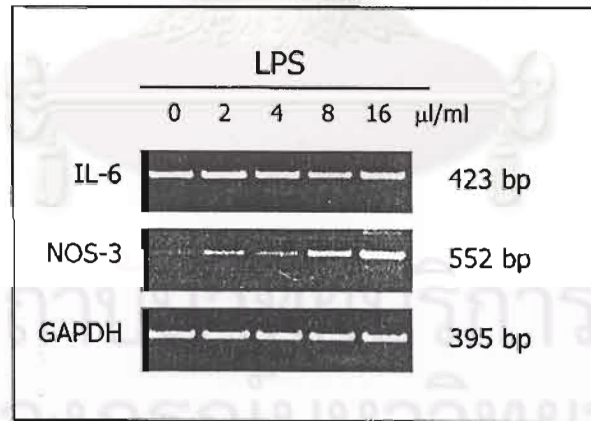
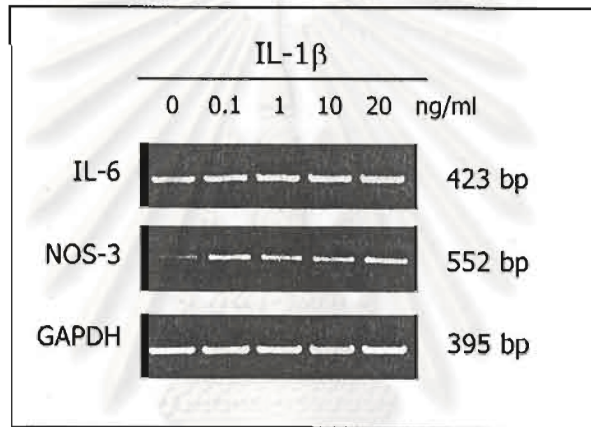
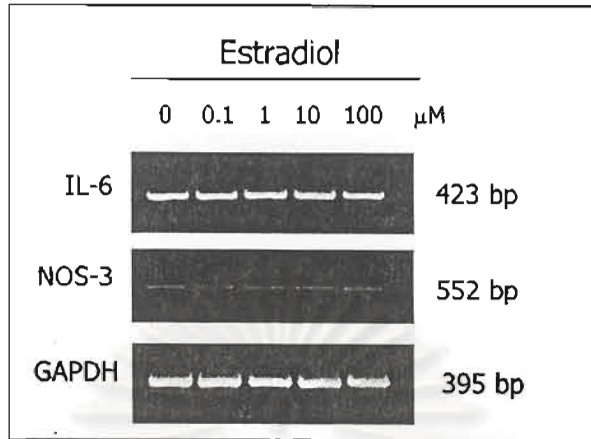


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 ภาพ PCR product ของ IL-6, NOS-3 และ GAPDH ในเซลล์เอ็นโดพริทนต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS

เซลล์เอ็นโดพริทนต์ถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงสกัด RNA จากเซลล์ และนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ IL-6 และ NOS-3 ด้วย RT-PCR โดยใช้ระดับของ GAPDH เป็น internal control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

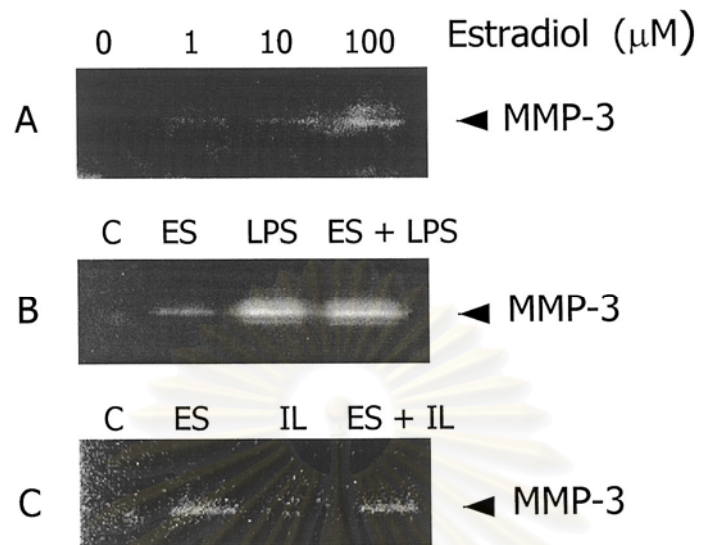


สงวนลิขสิทธิ์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 ภาพจาก casein zymography แสดงการเปลี่ยนแปลงของ MMP-3 ในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol (ES), IL-1 β (IL) หรือ LPS

เซลล์เอ็นดีคปริทันต์ถูกกระตุ้นด้วย estradio, IL-1 β หรือ LPS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ MMP-3 ด้วยเทคนิค casein zymography ในรูปที่ 5A แสดงผลของการกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol ที่ความเข้มข้น 0,1,10 และ 100 ไมโครโมลาร์ โดยระดับของ MMP-3 จะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อกระตุ้นด้วย estradiol ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

ในรูป 5B และ C แสดงผลของการกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol ร่วมกับ IL-1 β (B) หรือ LPS (C) ตามลำดับ

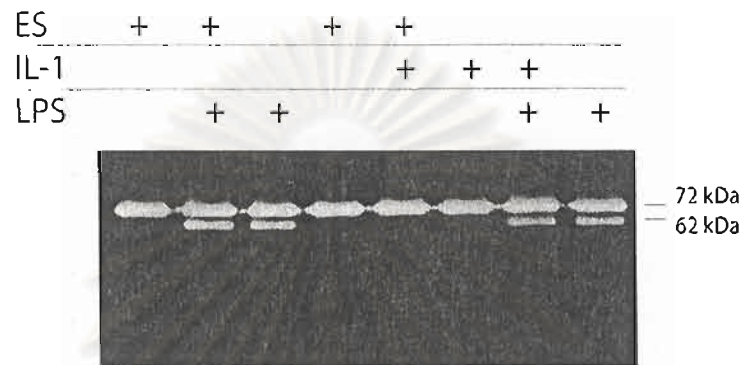


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 ภาพจาก gelatin zymography แสดงการเปลี่ยนแปลงของ MMP-2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย estradiol (ES), IL-1 β (IL-1) หรือ LPS

เซลล์เอ็นอีทีปรีทันต์ถูกกระตุ้นด้วย estradiol, IL-1 β หรือ LPS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับในรูปที่ 5 จากนั้นวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ MMP-2 ด้วยเทคนิค gelatin zymography

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

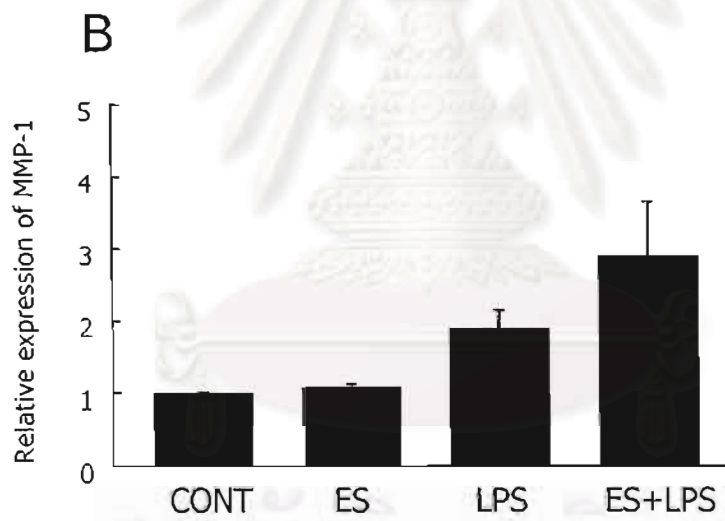
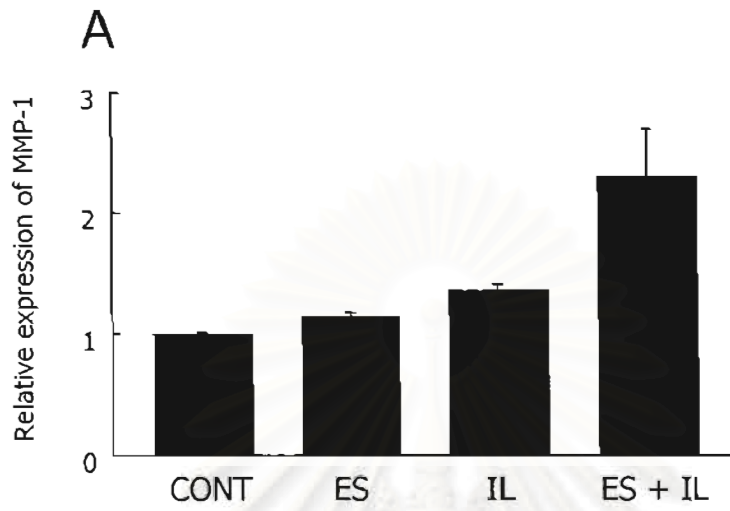


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 กราฟแสดงผลร่วมของ estradiol และ IL-1 β หรือ LPS ที่มีต่อการหลั่ง MMP-1

เซลล์เอ็นดีปรีทนต์ถูกกระตุ้นเหมือนในรูปที่ 6 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงวัดปริมาณของ MMP-1 ด้วยเทคนิค western analysis และอ่านค่าของแถบสีด้วย densitometer นำค่าที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง มาพล็อตกราฟ โดยปรับให้ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 กราฟ A แสดงผลร่วมระหว่าง estradiol (ES) กับ IL-1 β (IL) ส่วนกราฟ B แสดงผลร่วมระหว่าง estradiol (ES) กับ LPS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

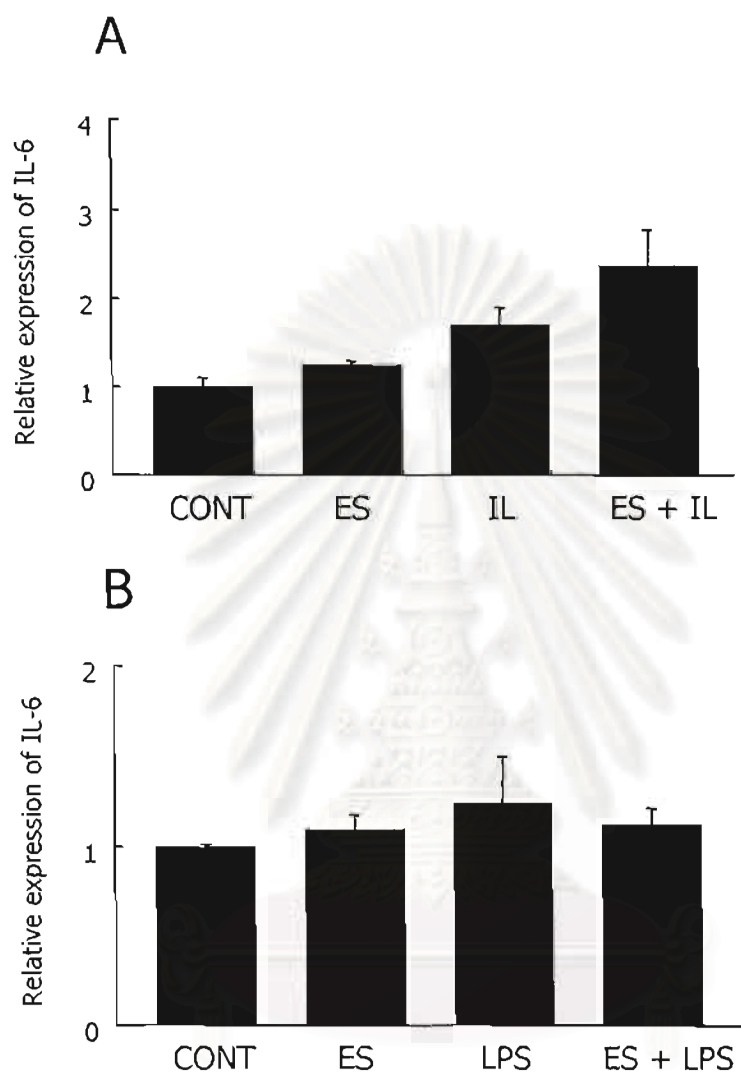


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 กราฟแสดงผลร่วมของ estradiol และ IL-1 β หรือ LPS ที่มีต่อการแสดงออกของ IL-6

เซลล์เอ็นดีบริทันต์ถูกกระตุ้นเหมือนในรูปที่ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงวัดการแสดงออกของ IL-6 ด้วยเทคนิค RT-PCR และอ่านค่าของแถบสีด้วย densitometer นำค่าที่ได้ปรับ (normalized) ด้วยค่าการแสดงออกของ GAPDH ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน นำผลจากการทดลอง 3 ครั้ง มาพล็อตกราฟ โดยปรับให้ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 กราฟ A แสดงผลร่วมระหว่าง estradiol (ES) กับ IL-1 β (IL) ส่วนกราฟ B แสดงผลร่วมระหว่าง estradiol (ES) กับ LPS

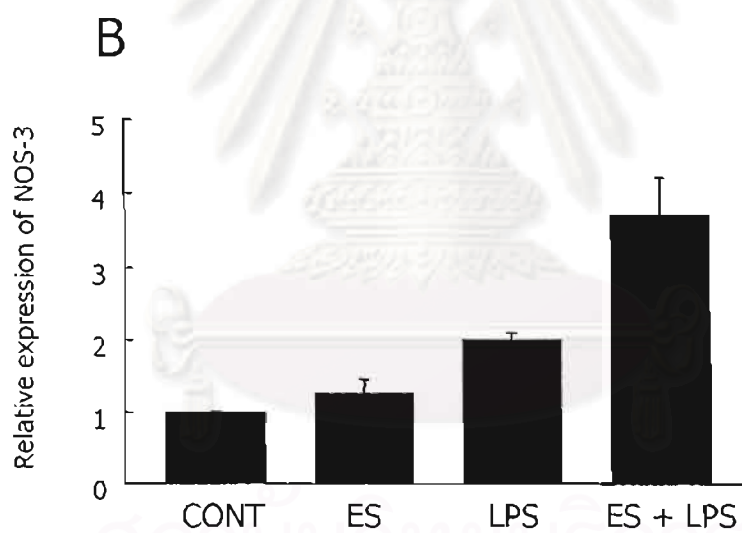
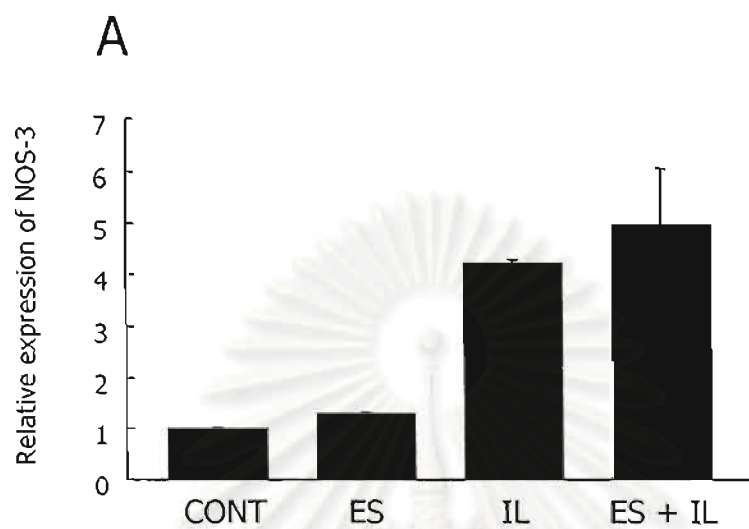
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 กราฟแสดงผลร่วมของ estradiol และ IL-1 β หรือ LPS ที่มีต่อการแสดงออกของ NOS-3

เซลล์เอ็นดีคปริทันต์ถูกกระตุ้นเหมือนในรูปที่ 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงวัดการแสดงออกของ NOS-3 ด้วยเทคนิค RT-PCR และอ่านค่าของแถบสีด้วย densitometer นำค่าที่ได้ปรับ (normalized) ด้วยค่าการแสดงออกของ GAPDH ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน นำผลจากการทดลอง 3 ครั้ง มาพล็อตกราฟ โดยปรับให้ค่าในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 กราฟ A แสดงผลร่วมระหว่าง estradiol (ES) กับ IL-1 β (IL) ส่วนกราฟ B แสดงผลร่วมระหว่าง estradiol (ES) กับ LPS



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก :

การเตรียมเซลล์ในการทดลองครั้งนี้ ใช้เนื้อเยื่อจากฟันทกรามซี่ที่ 3 ที่ถอนจากผู้ป่วยทั้งชายและหญิง ในช่วงอายุประมาณ 18-30 ปี ซึ่งมาถอนฟันเนื่องจากเป็นฟันคุด หรือต้องการจัดฟัน โดยไม่มีการผูกหรือการอักเสบของเหงือก และเนื้อเยื่อปริทันต์ เหตุผลที่เลือกใช้เนื้อเยื่อจากผู้ป่วยในช่วงอายุนี้นี้ เนื่องจากข้อจำกัดดังนี้

1. เนื้อเยื่อที่เตรียมจากผู้ป่วยที่มีอายุมาก เซลล์ที่ได้จะมีอัตราการเจริญที่ช้า และไม่ค่อยตอบสนอง รวมทั้งรูปร่างของเซลล์จะใหญ่ขึ้น และแผ่แบนกับจานเลี้ยงเซลล์ และมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดในเซลล์ที่อยู่บนจานเลี้ยงเดียวกัน ต่างจากเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยอายุน้อยที่จะแข็งแรง และมีรูปร่างเป็นกระสวยเหมือนกันทุกๆ เซลล์ และเหมือนกันในแต่ละรุ่น จนถึงประมาณรุ่นที่ 7-8 ก็จะเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น โตช้าลง และเริ่มแผ่แบนติดกับจานเลี้ยง ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงพยายามเลือกใช้เซลล์ในรุ่นแรกๆ คือรุ่นที่ 3-4 เท่านั้น
2. หากเลือกผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 18 ปี ในประการแรก จะได้ผู้ป่วยจำนวนน้อย ทำให้เก็บเนื้อเยื่อได้น้อยลง ก็จะมีปัญหาด้านจำนวนเนื้อเยื่อ และในประการที่ 2 ผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 18 ปีนั้น อาจจะไม่สร้างรากฟันกรามซี่ที่ 3 ได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดปัญหาในการเก็บเนื้อเยื่อ จึงเลือกที่จะไม่ใช้
3. หากจะให้แบ่งช่วงอายุ 18-30 ให้แยกย่อยไปอีก จะเป็นปัญหาเกี่ยวกับการเก็บเนื้อเยื่อ รวมทั้งเป็นปัญหาต่อภาควิชาศัลยศาสตร์ที่ช่วยดำเนินการเก็บเนื้อเยื่อด้วย

ภายหลังจากที่ได้เนื้อเยื่อแล้ว จะทำการเลี้ยงจนเซลล์เคลื่อนจากเนื้อเยื่อมาอยู่บนจานเลี้ยงเจริญแบ่งตัวเต็มจานเลี้ยง จากนั้นถ่ายลงในจานเลี้ยงใหม่ เรียกว่ารุ่นที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่า จากการเลี้ยงในลักษณะดังกล่าว เซลล์จะเจริญโดยจะปลอดจากอิทธิพลของ systemic factors หรืออิทธิพลของฮอร์โมนเพศ เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2-3 รุ่นของเซลล์ และคณะผู้วิจัยไม่พบความแตกต่างของเซลล์ในเพศหญิงและเพศชาย ในแง่ของการตอบสนองต่อเอสโตรเจน หรือ ฮอร์โมนอื่นๆ

ในประเด็นถัดมา เนื่องจากเซลล์ที่เตรียมได้จากผู้ป่วยแต่ละคน จะถูกนำมาใช้ในการทดลองในช่วงระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้น คือในรุ่นที่ 3 และ 4 ดังนั้น การทดลองแต่ละครั้งจะใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วยคนละคนกัน แต่ทุกๆ การทดลองจะทำสามครั้ง โดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วยสามคน และผลการทดลองจะต้องเป็นไปในทิศทางเดียวกันทั้งสามการทดลอง จึงจะสรุปได้ ซึ่งในกรณีที่การตอบสนองเกิดเหมือนกันในทั้งสามการทดลองนั้น การสรุปผลน่าจะกระทำได้โดยไม่จำเป็นต้องอิงสถิติมากนัก แต่ในกรณีที่ผลการทดลองแตกต่างกัน คณะผู้วิจัยจะทำการเพิ่มจำนวนเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอีกอย่างน้อย 3 ชุด เพื่อที่จะใช้หลักการทางสถิติเข้าไปอ้างอิงได้

