จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

อิทธิพลของ TNF-α ต่อการสร้าง MMP-13, RANKL และ M-CSF ในเซลล์เพาะเลี้ยงเอ็นยึดปริทันต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

ประสิทธิ์ ภวสันต์
ทัศนีย์ ยงชัยตระกูล

มกราคม 2549

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

อิทธิพลของ TNF-α ต่อการสร้าง MMP-13, RANKL และ M-CSF ในเซลล์เพาะเลี้ยงเอ็นยึดปริทันต์

The effect of TNF-α on the expression of MMP-13, RANKL and M-CSF in cultured periodontal ligament cells

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

ประสิทธิ์ ภวสันต์ และ ทัศนีย์ ยงชัยตระกูล

มกราคม 2549

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Kim Mansky มหาวิทยาลัย Minesota ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่กรุณาให้เซลล์ RAW264.7 ขอบคุณอาจารย์ และบุคลากรของภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บเนื้อเยื่อฟันจากผู้ป่วย ขอบคุณอาจารย์และบุคลากรภาควิชากายวิภาคศาสตร์ สำหรับความสะดวกห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณคณะอนุกรรมการบริหารทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้การสนับสนุนเงินวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย : อิทธิพลของ TNF-α ต่อการสร้าง MMP-13, RANKL และ M-CSF ในเซลล์เพาะเลี้ยงเอ็นยึดปริทันต์

ชื่อผู้วิจัย : ประสิทธิ์ ภวสันต์ และ ทัศนีย์ ยงชัยตระกูล

เดือนปีที่ทำวิจัยสำเร็จ : มกราคม 2549

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เซลล์เอ็นยึดปริทันต์สามารถตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียและไซโตไคน์ ในภาวะที่มีการอักเสบ โดยหลั่งเอนไซม์ เมทริกซ์เมแทโลโปรทีเนส-13 (MMP-13) เพิ่มขึ้น และสร้างโปรตีนนิวเคลียแฟคเตอร์แคปปาบี ไลแกนด์ (RANKL) ซึ่งช่วยกระตุ้นการเกิดเซลล์สลายกระดูก (osteoclasts) แต่การเกิดเซลล์สลายกระดูกจำเป็นต้องมี แมคโครฟาจ-โคโลนี สติมูเลติง แฟคเตอร์ (M-CSF) ร่วมด้วย เราจึงศึกษาว่า เซลล์เอ็นยึดปริทันต์สามารถสร้าง M-CSF และ MMP-13 ในการตอบสนองต่อไซโตไคน์ที่เกี่ยวกับการอักเสบในรอยโรคปริทันต์ คือ ทูเมอร์เนโครสิส แฟคเตอร์ แอลฟา (TNFα) หรือไม่

วิธีการวิจัย: กระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงเอ็นยึดปริทันต์ด้วย TNFα ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม ศึกษาการแสดงออกของ M-CSF, RANKL และ MMP-13 ด้วยอาร์ที-พีซีอาร์ วิเคราะห์การสร้างโปรตีนด้วยอีไลซาร์ หรือ เวสเทอร์น อนาไลซิส ใช้แอนติบอดีต่อรีเซบเตอร์ของทีเอนเอฟ (TNFR) ในการยับยั้ง เพื่อศึกษาว่าการกระตุ้นเกิดผ่านรีเซบเตอร์ใด ตรวจสอบการเคลื่อนของเซลล์

ผล: TNFα กระตุ้นการแสดงออกและการสร้างโปรตีนของ M-CSF, RANKL และ MMP-13 ผลต่อ M-CSF และ MMP-13 สามารถถูกยับยั้งบางส่วนได้ด้วย เกลือไพโรลิดีนขไดไธโอคาร์บาเมทแอมโมเนียม (PTDC) และ LY294002 แต่ไม่สามารถยับยั้งด้วย NS398 ผลการกระตุ้นลดลงเมื่อยับยั้ง TNFR1 นอกจากนี้ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากเซลล์ที่กระตุ้นด้วย TNFα มีผลในการดึงดูดการเคลื่อนของเซลล์ RAW264.7

สรุป: เซลล์เอ็นยึดปริทันต์สร้าง M-CSF, MMP-13 และ RANKL เพิ่มขึ้น ในการตอบสนองต่อ TNFα การเพิ่มขึ้นของโปรตีนเหล่านี้ น่าจะเป็นกลไกที่เซลล์ใช้ในการมีส่วนร่วมทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ กลไกการกระตุ้นส่วนหนึ่งเกิดผ่าน NFkB และ PI3K โดยผ่านรีเซบเตอร์ที่เป็น TNFR1

Project Title : The effect of TNF-α on the expression of MMP-13, RANKL and M-CSF in cultured periodontal ligament cells

Investigators : Prasit Pavasant and Tussanee Yongchaitrakul

Date : January 2006

Abstract

Objectives: Human periodontal ligament (HPDL) cells respond to periopathogenic factors and inflammatory cytokines by increasing matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) and support osteoclastogenesis by expressing receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL). As osteoclastogenesis requires the presence of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), we examine if HPDL cells secrete M-CSF and MMP-13 in responding to tumor necrosis factorα (TNFα).

Methods: Cultured HPDL cells were treated with TNFα in serum-free condition. The expression of M-CSF and RANKL was determined by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), respectively. Inhibitors and anti-TNF receptors (TNFR) neutralizing antibodies were used for the inhibitory experiments. Migration assay was performed.

Results: TNFα up-regulated M-CSF, MMP-13 as well as RANKL in HPDL cells. The effect on M-CSF expression could be partially blocked by pyrrolidine-dithiocarbamate ammonium salt (PTDC) and LY294002 but not by NS398. Neutralizing antibody to TNFR1 could diminish the effect of TNFα. In addition, TNF-treated culture medium exhibited chemotactic effect for RAW264.7.

Conclusion: HPDL cells are capable of secreting M-CSF in addition to expressing RANKL in responding to TNFα. The up-regulation of M-CSF is possibly one of the mechanism that contributes to periodontal tissue destruction in response to

inflammatory cytokines. The up-regulation is partly through NFkB and PI3K and possibly involves TNFR1.

Key words: Tumor necrosis factorα, macrophage colony-stimulating factor, human periodontal ligament cells.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	4
ผลการทดลอง	8
สรุปและวิเคราะห์ผล	9
เอกสารอ้างอิง	13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 ภาพ PCR product และปริมาณของ M-CSF ของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่กระตุ้นด้วย TNFα 18

รูปที่ 2 ภาพ PCR product และโปรตีนของ RANKL ของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่กระตุ้นด้วย TNFα 19

รูปที่ 3 การแสดงออกและปริมาณโปรตีนของ M-CSF และ RANKL ในภาวะที่ถูกยับยั้งด้วย NS398 20

รูปที่ 4 แสดงผลการยับยั้ง M-CSF ด้วยสารยับยั้งต่อ PI3K และ NFkB 21

รูปที่ 5 แสดงผลการยับยั้ง M-CSF ด้วยแอนติบอดีต่อ TNFR1 และ TNFR2 22

รูปที่ 6 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ในการทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำการเคลื่อนของเซลล์ 23

รูปที่ 7 ภาพ PCR product และปริมาณของ MMP-13 ของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่กระตุ้นด้วย TNFα 24

รูปที่ 8 แสดงผลการยับยั้ง MMP-13 ด้วยสารยับยั้งต่อ PI3K และ NFkB 25

รูปที่ 9 แสดงผลการยับยั้ง MMP-13 ด้วยแอนติบอดีต่อ TNFR1 และ TNFR2 26

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ เป็นเนื้อเยื่อที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ และยึดอยู่ระหว่างกระดูกและเคลือบรากฟัน (cemetum) เพื่อทำหน้าที่รองรับแรงบดเคี้ยว เซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเอ็นยึดปริทันต์หรือที่ต่อไปจะเรียกว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament cells; PDL cells) ในภาวะปรกติจะทำหน้าที่ในการรักษาสมดุล (homeostasis) และช่วยในการปรับเปลี่ยน (turnover) เนื้อเยื่อปริทันต์ นอกจากนี้ เซลล์เหล่านี้ ยังมีลักษณะเฉพาะที่ใกล้เคียงกับเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) คือสามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) และสร้างโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อแข็งเมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสมด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่แสดงว่า เซลล์เอ็นยึดปริทันต์เหล่านี้ ทำหน้าที่สำคัญในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อปริทันต์ในส่วนของกระดูก และเคลือบรากฟัน

ในภาวะที่เกิดโรคปริทันต์อักเสบ เซลล์ของเนื้อเยื่อปริทันต์สามารถตอบสนองต่อแบคทีเรียโดยสร้างไซโตไคน์ (cytokines) หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคินส์-1 (interleukin-1; IL-1) และทูแมอร์เนโครสิสแฟคเตอร์-อัลฟา (tumor necrosis factor-α; TNF-α) รวมทั้งเอนไซม์เมทริกซ์เมแทโลโปรทีเนส (Matrix metalloproteinase; MMP) ที่สามารถย่อยสลายเส้นใยคอลลาเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อปริทันต์ (Saglie et al., 1990; Quintero et al., 1995; Kesavalu et al., 2002) จึงเห็นได้ว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์เองก็มีบทบาททั้งในด้านของการทำลายและการเสริมสร้างเนื้อเยื่อปริทันต์

TNF-α เป็นไซโตไคน์ที่สามารถเหนี่ยวนำการเกิดเซลล์ทำลายกระดูก (osteoclasts) ได้ (Lam et al., 2002; Nanes, 2003) และจัดเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญ ในรอยโรคที่เกี่ยวข้องกับการทำลายกระดูกและข้อต่อ เช่น โรครูมาตอยส์ (rheumatoid arthritis) (Romas et al., 2002) โดยพบว่า TNF-α สามารถเหนี่ยวนำการเกิดเซลล์ทำลายกระดูกจากเซลล์มาโครฟาจ และสโตรมาเซลล์ในไขกระดูก (bone marrow macrophage and stromal cell) กลไกการเหนี่ยวนำนี้ ส่วนหนึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำการแสดงออกของรีเซพเตอร์แอคติเวเตอร์ออฟนิวเคลียแฟคเตอร์-แคปปาบีไลแกนส์ (Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligands; RANKL) ในเซลล์กระดูก แต่อีกส่วนหนึ่งเชื่อว่าไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ RANKL และมีรายงานว่า เมื่อ

TNF-α และ RANKL พร้อมกัน โมเลกุลทั้งสองนี้ สามารถเสริมฤทธิ์ของกันและกันในการกระตุ้นการเกิดเซลล์ทำลายกระดูกด้วย (Komine et al., 2001)

นอกจากการกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL ในเซลล์กระดูกแล้ว TNF-α สามารถกระตุ้นการหลั่งมาโครฟาจ-โคโลนีสติมูเลติงแฟคเตอร์ (Macrophage-colony stimulating factor; M-CSF) จากเซลล์กระดูกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของ TNF-α ในการเป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นการทำลายกระดูก (Yao et al., 2000) กลไกการทำงานของ TNF-α จะเกิดผ่าน ทูแมอร์เนโครสิสแฟคเตอร์-อัลฟา รีเซบเตอร์ (TNFR) บนผิวเซลล์ ซึ่งมี 2 ชนิด คือ TNFR1 และ TNFR2 และสัญญาณที่เกิดผ่าน TNFR นี้ พบว่าจะไปกระตุ้นการทำงานของนิวเคลียแฟคเตอร์-แคปปาบี (nuclear factor-kappa B; NFkB) หรือกระตุ้นเอ็นไซม์ mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) ภายในเซลล์ อย่างไรก็ดี โมเลกุลเป้าหมายของ TNFR ตัวอื่นๆ ยังไม่มีรายงานที่ชัดเจน (Nanes; 2003)

เซลล์เอ็นยึดปริทันต์สามารถสร้าง RANKL เพิ่มขึ้นในบริเวณที่ต้องการการละลายของกระดูก ซึ่งอาจเกิดจากแรงกด (Kanzaki et al., 2002) แรงดึงจากการจัดฟัน (Oshiro et al., 2002) หรือบริเวณที่มีการละลายกระดูกเพื่อให้ฟันขึ้นตามธรรมชาติ (Kawamoto et al., 2002) รวมทั้งเนื้อเยื่อที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ (Crotti et al., 2003; Liu et al., 2003) เนื่องจาก RANKL เป็นโปรตีนที่มีบทบาทกระตุ้นเซลล์สลายกระดูกให้สร้างเอนไซม์เพื่อละลายกระดูก การเพิ่มขึ้นของ RANKL จึงเป็นการกระตุ้นให้มีการทำลายเนื้อเยื่อมากขึ้น นอกจากเหนี่ยวนำให้เซลล์ละลายกระดูกทำงานแล้ว RANKL ยังมีความสำคัญในการกระตุ้นเซลล์สลายกระดูกที่ยังไม่โตเต็มที่ (pre-osteoclasts) ให้กลายเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่ (mature osteoclasts) โดยทำงานร่วมกับ M-CSF ซึ่งในเนื้อเยื่อกระดูก เซลล์ที่จะทำหน้าที่ในการสร้าง RANKL และ M-CSF ในกระบวนการของการปรับเปลี่ยนและควบคุมการสร้างและการทำลายกระดูก (Miyamoto and Suda, 2003; Nanes, 2003) แต่สำหรับเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ยังไม่มีรายงานว่า เซลล์เอ็นยึดปริทันต์สามารถสร้าง M-CSF เช่นเดียวกับเซลล์สร้างกระดูกในวงจรของการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์หรือไม่ การที่เซลล์เอ็นยึดปริทันต์มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์สร้างกระดูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถสร้าง RANKL ช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจว่า เซลล์นี้น่าจะมีความสามารถในการสร้าง M-CSF ในกระบวนการของการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ด้วย

M-CSF เป็นโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการดิฟเฟอเรนชิเอท (differentiate) ของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซท์ (monocyte) ซึ่งทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการดิฟเฟอเรนชิเอทของเซลล์ในกลุ่มของโมโนไซท์รวมทั้งเซลล์สลายกระดูก แต่ในกรณีที่เซลล์ pre-osteoclasts ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย M-CSF เพียงสัญญาณเดียว จะไม่เพียงพอต่อการพัฒนาไปเป็นเซลล์สลายกระดูก ดังนั้น สัญญาณจาก RANKL จึงมีความจำเป็น RANKL เป็นโปรตีนผิวเซลล์ที่พบได้บนผิวของเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์สโตรมาในไขกระดูก (bone marrow stromal cells) เซลล์สร้างกระดูก รวมทั้งในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ โดย RANKL จะจับกับ RANK ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบพบผิวของ pre-osteoclasts และ osteoclasts และการจับกันของ RANK-RANKL เมื่อเกิดในสภาวะที่เซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย M-CSF ก็จะกระตุ้นให้เซลล์ดิฟเฟอเรนชิเอทเป็นเซลล์สลายกระดูก นอกจากนี้ ในกรณีของเซลล์สลายกระดูกที่โตเต็มที่ การกระตุ้นเซลล์ด้วย RANKL ยังเป็นการส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของเซลล์ (activation) และช่วยป้องกันการตายของเซลล์ด้วย (survival signal) (Lerner 2004)

นอกจากการทำลายเนื้อเยื่อแข็งแล้ว TNF-α ยังมีผลต่อการย่อยสลายเนื้อเยื่อยึดต่อ ด้วยการกระตุ้นการหลั่ง MMP, MMP ที่มีบทบาทในการย่อยเส้นใยคอลลาเจนส่วนใหญ่เป็น MMP ในกลุ่มคอลลาจิเนส (collagenase) คือ MMP-1 และ MMP-8 (Birkedel-Hensen, 1993; Graves and Cochran, 2003) อย่างไรก็ตาม มีรายงานเมื่อเร็วๆ นี้ว่าระดับของ MMP-13 เพิ่มสูงขึ้นในรอยโรคปริทันต์อักเสบ (Kiili et al., 2002; Tervahartiala et al., 2002) MMP-13 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มคอลลาจิเนสอีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ในกระบวนการปรับเปลี่ยนของเนื้อเยื่อ (remodeling) มีบทบาทชัดเจนในโรคข้อต่ออักเสบ (Liacini et al., 2003) แต่ยังไม่มีความชัดเจนเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ MMP-13 กับไซโตไคน์ที่เกี่ยวกับการอักเสบในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์

คณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ตอบสนองต่อ TNF-α ด้วยการหลั่ง RANKL, M-CSF และ MMP-13 ซึ่งมีส่วนเสริมให้ osteoclasts ทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ในภาวะที่เป็นโรค จากสมมติฐานดังกล่าว จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ของไซโตไคน์ที่เกิดขึ้นในภาวะที่มีการอักเสบในรอยโรคปริทันต์ คือ TNF-α กับการตอบสนองของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ต่อ TNF-α ในแง่ของการสร้าง RANKL, M-CSF และ MMP-13 ซึ่งเป็นวงจรที่กระตุ้นให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ ศึกษาอิทธิพลของ TNF-α ต่อเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ โดย

1) ตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของ MMP-13, RANKL และ M-CSF ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย TNF-α

2) ศึกษา signaling pathway ของ TNF-α ที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนในข้อที่ 1

วิธีดำเนินการวิจัย

<u>การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์</u>

เซลล์เอ็นยึดปริทันต์จะถูกเพาะเลี้ยงขึ้นจากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ของผู้ป่วยที่มาถอนฟันที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ ที่ไม่มีรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์ ในการทดลองจะเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อของคนไข้อย่างน้อย 3 คนและทำการทดลองซ้ำสาม เตรียมเซลล์โดยขูดเนื้อเยื่อปริทันต์ออกจากผิวรากฟันเฉพาะที่บริเวณตอนกลาง (middle 1/3) ของรากฟัน นำไปวางในจานเลี้ยงเซลล์ (Nunc, Roskilde, Denmark) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ 10, กลูตามีน (glutamine), ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotics) อาหารเลี้ยงเซลล์และส่วนประกอบเป็นผลิตภัณฑ์ของ Gibco BRL, Carlsbad, CA.

เมื่อเซลล์บนจานเลี้ยงเจริญจนเต็มพื้นที่ของจานเลี้ยงเซลล์แล้ว เซลล์จะถูกถ่ายออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ เริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 หลังจากนั้นเซลล์จะถูกหว่านใหม่ในอัตราส่วน 1:3 เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-6

<u>การกระตุ้นเซลล์ด้วย TNF-α</u>

เซลล์ถูกหว่านในจานเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร เลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนจะเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม กระตุ้นเซลล์ด้วย TNF-α (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ที่ความเข้มข้น 0.1,1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ และ cell extract เพื่อนำไปวิเคราะห์ เพื่อเลือกความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถให้ผลในการกระตุ้น คือ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

สำหรับการศึกษาสัญญาณที่ส่งผ่านเข้าเซลล์ เซลล์จะถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้งเป็นเวลา 30 นาทีก่อนที่จะได้รับการกระตุ้นด้วย TNF-α ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สารยับยั้งที่ใช้คือ

1.4 μM LY294002 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI) ซึ่งเป็น phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) inhibitor และ 50 μM Pyrrolidine-dithiocarbamate ammonium salt (PTDC) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ซึ่งเป็น NFkB inhibitor เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ และ cell extract หลังการกระตุ้น 24 ชั่วโมง

เพื่อศึกษาว่า TNF-α กระตุ้นเซลล์โดยผ่านรีเซบเตอร์ตัวใด คือ TNFR1 (p55r) และ TNFR2 (p75r), inhibitory antibodies ต่อ TNFR1 (mouse monoclonal IgG_1 against human TNFR1) และ TNFR2 (mouse monoclonal IgG_{2A} against human TNFR2) (R&D System, Minneapolis, MN) ได้ถูกใช้ในการยับยั้ง โดยใช้ anti-TNFR1 antibody 6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือ anti-TNFR2 antibody 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 30 นาทีก่อนที่จะกระตุ้นเซลล์ด้วย TNFα 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลาอีก 24 ชั่วโมง

<u>การวิเคราะห์ระดับ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR</u>

RNA จากเซลล์ในแต่ละการทดลอง จะถูกแยกด้วย TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) และวัดปริมาณ RNA ด้วย UV-spectrophotometer ที่ OD 260/280 จากนั้นนำ RNA จำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลอง ไปผ่านกระบวนการ reverse transcriptase (RT) โดยใช้เอนไซม์ AMV (avian myeloblastosis virus) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) เพื่อสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (complementary DNA) หรือ cDNA ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ลำดับของกรดอะมิโนของไพรเมอร์คือ

M-CSF	forward	5' CTA AGC TGG ACG CAC AGA CCA 3'
	reverse	5' TCT CAG GCT GCA CAC CTT 3'
RANKL	forward	5' CCA GCA TCA AAA TCC CAA GT 3'
	reverse	5' CCC CTT CAG ATG ATC CTT C 3'
MMP-13	forward	5' GGC GAC TTC TAC CCA TTT GA 3'
	reverse	5' ATA CGG TTG GGA AGT TCT GGC 3'
GAPDH	forward	5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT 3'
	reverse	5' TCA CAC CCA TGA CGA ACA TGG 3'

นำ cDNA ไปขยายสัญญาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์ Taq polymerase และใช้ primer ที่จำเพาะต่อ M-CSF, MMP-13, RANKL และ GAPDH เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว PCR products ที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน agarose gel ที่มีความเข้มข้นของ agarose ร้อยละ 2 และมีส่วนผสมของ ethidium bromide วิเคราะห์ความเข้มของ PCR product ด้วย Scion Image analysis software (Scion Corporation, Frederick, Maryland)

การวิเคราะห์ด้วย ELISA

เมื่อครบกำหนด 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ M-CSF หรือ MMP-13 ด้วยชุด ELISA (Quantikine® R&D System Inc., MN) ตามคำแนะนำของบริษัท โดยหยอดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการวิเคราะห์ลงใน microplate ที่เคลือบด้วย mouse monoclonal antibody against human M-CSF หรือ MMP-13 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง และย้อมต่อด้วย polyclonal antibody against M-CSF หรือ MMP-13 conjugated to horseradish peroxidase เป็นเวลาอีก 2 ชั่วโมง จากนั้นใส่ substrate เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะยับยั้งปฏิกิริยา และนำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าดูดกลืนแสง

การวิเคราะห์ด้วย Western blot analysis

เซลล์จะถูกละลายด้วย RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8.0) วัดปริมาณโปรตีนด้วยชุดวัดโปรตีน BCA™ (Pierce, Rockford, IL) แล้วนำไปแยกด้วยไฟฟ้าใน acrylamide gel (polyacrylamide gel electrophoresis) และเคลื่อนย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose membrane) (Immobilon-P, Millipore Corporation, Bedford, MA) ด้วยไฟฟ้า

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้ ไปย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ RANKL หรือ เบตาแอคติน (beta-actin) หรือ MMP-13 (แอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดได้จาก Chemicon International, Temecula, CA) ต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ต่อกับไบโอติน (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) และต่อด้วย peroxidase-conjugated streptavidin (Zymed, South San Francisco, CA) และขยายสัญญาณโดยเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้ว ด้วยชุดขยายสัญญาณแบบ

(Chemiluminescence detection system) (Pierce, Rockford, IL) จากนั้นจึงตรวจจับสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์ม (CL-X posture film) (Pierce, Rockford, IL)

การดึงดูดการเคลื่อนของเซลล์ (Chemotaxis assay)

เซลล์ถูกเลี้ยงในภาวะที่มี และไม่มีการกระตุ้นจาก TNF-α เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารปราศจากซีรัมที่ไม่มี TNF-α และเลี้ยงต่อเป็นเวลาอีก 24 ชั่วโมง จากนั้น เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ (เรียก conditioned medium) เพื่อนำไปทดสอบอิทธิพลของสารที่เซลล์สร้างและหลั่งออกมาสู่อาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทดสอบความสามารถในการดึงดูดการเคลื่อนของเซลล์ (chemotactic effect)

การทดสอบ chemotactic effect ของ conditioned medium ได้ทดสอบกับ RAW264.7 ซึ่งเป็น precursor cell line ของ osteoclasts โดยใช้ 48-well chemotaxis chamber (Neuro probe, Gaithersburg, MD) เซลล์ RAW264.7 (56,000 เซลล์/56 ไมโครลิตร) ถูกหว่านบนแผ่น polycarbonate membrane (pore size 12 ไมครอน) ที่กั้นระหว่าง chamber บนและล่าง เซลล์ที่ถูกหว่านลงบน membrane สามารถเคลื่อนข้าม membrane จากด้านบนไปด้านล่าง ซึ่งหล่อไว้ด้วย conditioned medium ใน chamber ล่าง รอให้เซลล์เคลื่อนเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ก่อนที่จะตรึงด้วย 4% paraformadehyde เป็นเวลา 30 นาที และย้อมด้วย hematoxylin 10 นาที ตรึง membrane บนสไลด์แก้ว และนำไปนับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± S.D. ด้วย ANOVA และใช้ Sheff's test for *post-hoc* analysis ค่า $p < 0.05$ เป็นค่าที่มีนัยสำคัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผล

ผลต่อ M-CSF และ RANKL

TNF-α ที่ 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร มีผลในการกระตุ้นการสร้าง M-CSF และ RANKL ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน การวิเคราะห์ด้วย RT-PCR พบว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์มีการแสดงออกของ M-CSF mRNA เพิ่มขึ้นตามลำดับความเข้มข้นของ TNF-α เมื่อได้รับการกระตุ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 1A) ผลจากการวิเคราะห์ด้วย ELISA พบว่าเซลล์สร้าง M-CSF เพิ่มขึ้น เห็นได้ชัดที่ความเข้มข้น 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ($p< 0.05$) (รูปที่ 1B) ในทำนองเดียวกัน เซลล์มีการแสดงออกของ RANKL mRNA (รูป 2A) และสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้นตามลำดับจากการวิเคราะห์ด้วย Western blot (รูป 2B) คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ความเข้มข้นที่ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

เพื่อตรวจสอบว่าการกระตุ้น M-CSF และ RANKL เกิดผ่าน cyclooxygenase-2 (COX-2) หรือไม่ เซลล์ถูกยับยั้งด้วย NS398 ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ COX-2 เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะกระตุ้นด้วย TNF-α ปรากฏว่า NS398 สามารถยับยั้งการแสดงออกของ RANKL ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ M-CSF ความเข้มของ PCR product เทียบต่อ GAPDH ที่เท่ากันได้แสดงไว้ในกราฟ (รูปที่ 3)

การกระตุ้น RANKL โดยผ่าน COX-2 ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ได้เคยมีรายงานไว้แล้ว (Fukushima et al, 2005; Kanzaki et al., 2002) คณะผู้วิจัยจึงศึกษากลไกของการกระตุ้น M-CSF โดยใช้สารยับยั้งอื่น พบว่า LY294002 และ PTDC สามารถลดการแสดงออกและการสร้างโปรตีน M-CSF ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4 และเพื่อตรวจสอบว่า TNF-α กระตุ้นเซลล์โดยผ่านรีเซบเตอร์ตัวไหน คณะผู้วิจัยได้ใช้ neutralizing antibody ต่อ TNFR1 และ TNFR2 พบว่า neutralizing antibody ต่อ TNFR1 ให้ผลยับยั้งได้บางส่วน (รูปที่ 5)

เนื่องจากมีรายงานว่า M-CSF เหนี่ยวนำการเคลื่อนของเซลล์ macrophage คณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า conditioned medium ที่เก็บจากเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α ซึ่งมี M-CSF รวมอยู่ด้วยนั้น น่าจะมีผลดึงดูดการเคลื่อนของเซลล์ โดยทดสอบกับ RAW264.7 ผลในรูปที่ 6 แสดงให้เห็นว่า conditioned medium จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α สามารถเพิ่มการเคลื่อนของ RAW264.7 ได้เป็น 5 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลต่อ MMP-13

TNF-α สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ MMP-13 mRNA และโปรตีน เมื่อวิเคราะห์ด้วย RT-PCR และ ELISA ตามลำดับ ความเข้มข้นที่ให้ผลชัดเจน คือที่ 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 7) จากการใช้สารยับยั้งสัญญาณที่ส่งผ่านเซลล์ พบว่าการกระตุ้น MMP-13 ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ เป็นไปในทำนองเดียวกับการกระตุ้น M-CSF คือ LY294002 และ PTDC ให้ผลยับยั้ง MMP-13 ได้บางส่วน แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ทั้งหมด ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน (รูปที่ 8) นอกจากนี้ neutralizing antibody ต่อ TNFR1 สามารถยับยั้งการกระตุ้นได้บางส่วนเช่นกัน แต่ไม่พบการยับยั้งจาก neutralizing antibody ต่อ TNFR2 (รูปที่ 9)

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

TNF-α เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทในรอยโรคปริทันต์อักเสบ และสามารถกระตุ้นการสร้าง RANKL ทั้งในเซลล์กระดูกและเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ซึ่งนำไปสู่การทำลายกระดูก งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า นอกจากการสร้าง RANKL แล้ว เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ยังตอบสนองต่อ TNF-α ด้วยการหลั่ง M-CSF ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ช่วยให้เซลล์อ่อนของเซลล์สลายกระดูก พัฒนาเป็นเซลล์สลายกระดูกที่เจริญเต็มที่

ผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่ากลไกการกระตุ้น M-CSF เกิดผ่าน TNFR1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่แสดงให้เห็นว่า TNFR1 เป็นรีเซบเตอร์หลักสำหรับ TNF-α (Abu-Amer et al., 2000; Nanes, 2003) Chen และ Goeddel (Chen and Goeddel, 2002) ได้แสดงหลักฐานว่า TNFR1 จะส่งสัญญาณผ่านโมเลกุลกลุ่มที่เป็น kinase และไปกระตุ้น NFkB และ cJun สำหรับเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ คณะผู้วิจัยพบว่า การกระตุ้นบางส่วนเกิดผ่าน PI3K และ NFkB เนื่องจากสามารถยับยั้งได้ด้วย LY294002 และ PTDC อย่างไรก็ตาม กลไกการกระตุ้น M-CSF แตกต่างจากการกระตุ้น RANKL ซึ่งการกระตุ้น RANKL เกิดจากการทำงานของ COX-2 แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า COX-2 ไม่ได้เกี่ยวกับการกระตุ้น M-CSF โดย TNF-α

M-CSF เป็น growth factor ที่มีอิทธิพลต่อ macrophage อย่างมาก นอกจากกระตุ้นอัตราการแบ่งตัว กระตุ้นการดิฟเฟอเรนชิเอทของเซลล์อ่อนในกลุ่ม monocyte-macrophage lineage แล้ว ยังช่วยส่งเสริมการแพร่และเคลื่อนของเซลล์ (Fuller et al., 1993; Webb et al.,

1996; Pixley et al., 2004) M-CSF สามารถถูกกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ที่เกี่ยวกับการอักเสบหลายชนิด TNF-α และอินเตอร์ลิวคินสามารถกระตุ้นการหลั่ง M-CSF ได้สูงมากในเซลล์อ่อนจากไขกระดูก (Besse et al., 2000) และในเซลล์ granulosa ของมนุษย์ (Kawano et al., 2004) นอกจากนี้ Tanabe และคณะ ยังได้รายงานว่า IL-1 กระตุ้นการหลั่ง M-CSF ในเซลล์ไลน์กระดูก ROS 17-2.8. งานวิจัยนี้เราพบว่า TNF-α กระตุ้นการหลั่ง M-CSF ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์

การเพิ่มการสร้าง M-CSF ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ มีความเป็นไปได้ที่จะมีผลช่วยให้เซลล์สลายกระดูกดิฟเฟอเรนชิเอท เนื่องจากมีรายงานว่า M-CSF ช่วยกระตุ้นการดิฟเฟอเรนชิเอทของเซลล์สลายกระดูก การทดลองในหนู osteopetrotic (op/op) ซึ่งยีนที่สร้าง M-CSF ไม่ทำงาน พบว่าหนูมีจำนวนเซลล์สลายกระดูกลดลงอย่างมาก ทำให้เกิดภาวะกระดูกหนา (osteopetrosis) (Yoshida et al., 1990; Wiktor-Jedrzejczac et al., 1982) Suda และคณะ และ Tanaka และคณะ พบว่า M-CSF จำเป็นสำหรับการดิฟเฟอเรนชิเอทของเซลล์อ่อนที่จะเจริญเป็นเซลล์สลายกระดูก (Suda et al., 1999; Tanaka et al., 1993) M-CSF ยังมีบทบาทในการช่วยการมีชีวิตของเซลล์สลายกระดูก เนื่องจากมีคุณสมบัติในการต้าน apoptosis ที่เกิดผ่าน mTOR/S6 kinase ในเซลล์สลายกระดูก (Wiktor-Jedrzejczac et al., 1982)

M-CSF ยังมีบทบาทช่วยการเคลื่อนของเซลล์ ทำหน้าที่เป็น chemoattractant สำหรับ macrophage (Webb et al., 1996) Fuller และคณะ ได้แสดงให้เห็นว่า M-CSF ช่วยการเคลื่อนของเซลล์สลายกระดูกจากกระดูกหนู (Fuller et al., 1993) ในการศึกษานี้ เราพบว่า โมเลกุลที่หลั่งจากเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย TNF-α สามารถเหนี่ยวนำการเคลื่อนของเซลล์ RAW264.7 ให้เคลื่อนผ่าน membrane ที่ใช้ทดสอบ migration assay จึงเป็นไปได้ที่ M-CSF ที่เซลล์สร้างและปล่อยสู่อาหารเลี้ยงเซลล์นั้น เป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยดึงดูดเซลล์ แม้ว่าในการทดลองนี้ยังไม่มีหลักฐานที่จะยืนยันข้อสมมติฐานนี้โดยตรง แต่ก็เป็นไปได้ที่จะคิดว่า M-CSF ที่เซลล์เอ็นยึดปริทันต์สร้างในการตอบสนองต่อ TNF-α มีส่วนช่วยให้เซลล์อ่อนของเซลล์สลายกระดูกเคลื่อนเข้ามาอยู่ในช่องรอบรากฟัน (periodontal space)

เซลล์เอ็นยึดปริทันต์มีบทบาททั้งในแง่ของการเสริมสร้างและการทำลาย ในสภาวะปรกติแล้ว เซลล์เหล่านี้จะทำหน้าที่รักษาสมดุลของเนื้อเยื่อ นอกจากการหลั่ง RANKL แล้ว เซลล์ยังสามารถหลั่งออสติโอโปรติเจริน (osteoprotegerin; OPG) ซึ่งทำหน้าที่ตรงข้ามกับ RANKL, OPG เป็น soluble protein ที่ทำหน้าที่เหมือน decoy receptor โดย OPG สามารถแย่งจับกับ RANKL

ทำให้ RANKL ไม่สามารถจับกับ RANK บนผิวเซลล์ของเซลล์สลายกระดูก และยับยั้งการเกิดเซลล์สลายกระดูกได้ เราพบว่าเนื้อเยื่อปริทันต์ที่ได้ทันทีจากฟันที่เพิ่งถอน ก็มีการแสดงออกของ M-CSF เช่นเดียวกับเซลล์เพาะเลี้ยง (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แสดงให้เห็นว่า ในภาวะปรกติ M-CSF น่าจะมีบทบาทในการรักษาสมดุลระหว่างการเสริมสร้างและการย่อยสลาย การที่เซลล์เอ็นยึดปริทันต์หลั่ง M-CSF ในการตอบสนองต่อ TNF-α เป็นการบ่งชี้ว่า ในภาวะที่มีการอักเสบ เซลล์มีบทบาทหลั่ง factor ที่ช่วยการทำลายหรือปรับเปลี่ยน (remodeling) กระดูกเบ้าฟัน

ผลการทดลองได้สนับสนุนว่า COX-2 เป็น signaling molecules ที่เกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของ RANKL โดย TNF-α ซึ่งสอดคล้องกับรายงานจำนวนมากที่แสดงว่า COX-2/PGE2 เป็นสัญญาณที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของ RANKL ในเซลล์หลายชนิด รวมทั้งเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (Chikazu et al., 2001, Han et al., 2005, Wei et al., 2005) การที่เซลล์เอ็นยึดปริทันต์สร้างทั้ง RANKL และ M-CSF เป็นการแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเซลล์มีบทบาทร่วมในกระบวนการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยยังพบว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ตอบสนองต่อ TNF-α โดยการสร้าง MMP-13 เพิ่มขึ้นด้วย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Nishikawa และคณะ (Nishikawa et al., 2002) และ Noguchi และคณะ (Noguchi et al., 2005) ที่แสดงว่า IL-1 หรือ TNF-α กระตุ้นการสร้าง MMP-13 ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายคอลลาเจน เราพบว่าสัญญาณที่เหนี่ยวนำการสร้าง MMP-13 โดย TNF-α ส่วนหนึ่งเกิดผ่าน PI3K และ NFkB โดยทั่วไปแล้ว เป็นที่ยอมรับว่า สัญญาณที่ควบคุม MMP-13 จะค่อนข้างซับซ้อน และเกี่ยวพันกับ signaling pathway หลายทาง (Liacini et al., 2003; Lechuga et al., 2004) ซึ่งรวมถึง NFkB, PI3K และ p38 MAPK นอกจาก PI3K และ NFkB แล้ว คณะผู้วิจัยได้ทดสอบกับสารยับยั้งตัวอื่น และพบว่า การใส่สารยับยั้ง p38 MAPK มีผลทำให้การแสดงออกของ MMP-13 mRNA เพิ่มขึ้น (ไม่ได้แสดงผลไว้) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rossa และคณะ (Rossa et al., 2005) ที่ทำการทดลองในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของหนู และพบว่าในภาวะปรกติ p38 MAPK เป็นสัญญาณที่ยับยั้ง (negative regulate) MMP-13 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีสัญญาณที่ควบคุมสมดุลอยู่ภายในเซลล์

โดยสรุป งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า TNF-α กระตุ้น M-CSF, RANKL และ MMP-13 ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ทั้งในระดับ mRNA และการสร้างโปรตีน การเพิ่มขึ้นของ M-CSF น่าจะมีส่วนช่วยดึงดูดและการดิฟเฟอเรนชิเอทของ เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast

precursor) การที่เซลล์สร้าง M-CSF และ RANKL รวมทั้ง MMP-13 ในการตอบสนองต่อ TNF-α เป็นการแสดงให้เห็นว่า เซลล์เอ็นยึดปริทันต์มีบทบาทในกระบวนการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ในภาวะปริทันต์อักเสบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Abu-Amer Y, Erdmann J, Alexopoulou L, Kollias G, Ross FP, Teitelbaum SL. Tumor necrosis factor recepters types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis. J Biol Chem 2000;275:27307-10.

Besse A, Trimoreau F, Praloran V, Denizot Y. Effect of cytokines and growth factors on the macrophage colony-stimulating factor secretion by human bone marrow stromal cells. Cytokine 2000;12:522-5.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol 1993;64:474-84.

Chen G, Goeddel D. TNF-R1 signaling: A beautiful pathway. Science 2002;296:1634-5.

Chikazu D, Katagiri M, Ogasawara T, et al. Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2: stimulation of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor expression in osteoblasts and inhibition of macrophage colony-stimulating factor function in osteoclast precursors. *J Bone Miner Res* 2001;16:2074-2081.

Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. J Periodontal Res 2003;38:380-7.

Fukushima H, Jimi E, Okamato F, Motokawa W, Okabe K. IL-1 induced receptor activator of NF-kappa B ligand in human periodontal ligament cells involves ERK-dependent PGE2 production. Bone 2005;36:267-75.

Fuller K, Owen JM, Jagger CJ, Wilson A, Moss R, Chambers TJ. Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. J Exp Med 1993;178:1733-44.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol 2003;74:391-401.

Han SY, Lee NK, Kim KH, et al. Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoclast precursors is involved in RANKL-induced osteoclastogenesis. *Blood* 2005;106:1240-1245.

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. J Bone Min Res 2002;17:2002.

Kawamoto S, Ejiri S, Hoshi K, Nagaoka E, Ozawa H. Immunolocalization of osteoclast differentiation factor in rat periodontium. Arch Oral Biol 2002;47:55-8.

Kawano Y, Fukuda J, Itoh H, Takai N, Nasu K, Miyakawa I. The effect of inflammatory cytokines on secretion of macrophage colony-stimulating factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human granulosa cells. Am J Reprod Immunol 2004;52:124-8.

Kesavalu L, Chandrasekar B, Eberole JL. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Oral Microbiol Immunol 2002;17:177-80.

Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, Salo T, Sorsa T. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. J Clin Periodontol 2002;29:224-32.

Komine M, Kukita A, Kukita T, Ogata Y, Hotokebuchi T, Kohashi O. Tumor necrosis factor-alpha cooperates with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. Bone 2001;28:474-83.

Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-□ induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to perssive levels of RANK ligand. J Clin Invest 2000;106:1481-8.

Lechuga CG, Hernandez-Nazara ZH, Dominguez Rosales JA, Morris ER, Rincon AR,

Rivas-Estilla AM, Esteban-Gamboa A, Rojkind M. TGF-beta1 modulates matrix metalloproteinase-13 expression in hepatic stellate cells by complex mechanisms involving p38MAPK, PI3-kinase, AKT, and p70S6k. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 Nov;287(5):G974-87. Epub 2004 Jul 8.

Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. Crit Rev Oral Biol Med 2004;15:64-81.

Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-□ is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kB transcription factors in articular chondrocytes. Exp Cell Res 2003;288:208-17.

Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A, Price P, Zheng MH. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. Int J Mol Med 2003;11:17-21.

Miyamoto T, Suda T. Differentiation and function of osteoclasts. Keio J Med 2003;52:1-7.

Nanes MS. Tumor necrosis factor –□: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. Gene 2003;321:1-15.

Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y. Effects of TNF-alpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res 2002;37:167-76.

Noguchi K, Ruwanpura SM, Yan M, Yoshida N, Ishikawa I. Down-regulation of interleukin-1alpha-induced matrix metalloproteinase-13 expression via EP1 receptors by prostaglandin E2 in human periodontal ligament cells. Oral Microbiol Immunol. 2005 Feb;20(1):56-9.

Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice. Anat Rec 2002;266:218-25.

Pixley FJ, Stanlet R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. TRENDS Cell Biol 2004;14:628-38.

Quintero JC, Piesco NP, Lankamp HH, Bowen L, Agarwal S. LPS responsiveness in periodontal ligament cells is regulated by tumor necrosis factor-alpha. J Dent Res 1995;74:1802-11.

Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFkB ligand and tumor necrosis factor-□ in bone destruction in rheumatoid arthritis. Bone 2002;30:340-6.

Rossa C Jr, Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK negatively regulates murine MMP-13 gene expression induced by IL-1beta and TNF-alpha in immortalized periodontal ligament fibroblasts. Matrix Biol. 2005 Oct;24(7):478-88. Epub 2005 Jul 19.

Saglie FR, Simon K, Merrill J, Koeffler HP. Lipopolysaccharide from Actinobacillus actinomycetemcomitans stimulates macrophages to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA and protein. Oral Microbiol Immunol 1990;5:256-62.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev 1999;20:345-57.

Tanabe N, Maeno M, Suzuki N, Fujisaki K, Tanaka H, Ogiso B, Ito K. IL-1□ stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts. Life Sci 2005;77:615-26.)

Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley FR, Kurokawa T, Suda T. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. J Clin Invest 1993;91:257-63.

Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G et al. 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.

Webb S, Pollard JW, Jones G. Direct observation and quantification of macrophage chemoattraction to the growth factor CSF-1. J Cell Sci 1996;109:793-803.

Wei X, Zhang X, Zuscik MJ, Drissi MH, Schwarz EM, O'Keefe RJ. Fibroblasts express RANKL and support osteoclastogenesis in a COX-2-dependent manner after stimulation with titanium particles. *J Bone Miner Res* 2005;20:1136-1148.

Wiktor-Jedrzejczak W, Ahmed A, Szcylik C, Skelly RR. Hematological characterization of congenital osteopetrosis in op/op mouse. Possible mechanism for abnormal macrophage differentiation. J Exp Med 1982;156:1516-27.

Yao GO, Sun BH, Insogna KL, Weir EC. Nuclear factor- kappaB p50 is required for tumpr necrosis factor-alpha-induced colony-stimulating factor-1 gene expression in osteoblasts. Endocrinology 2000;141:2914-22.

Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. Nature 1990;45:442-4.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

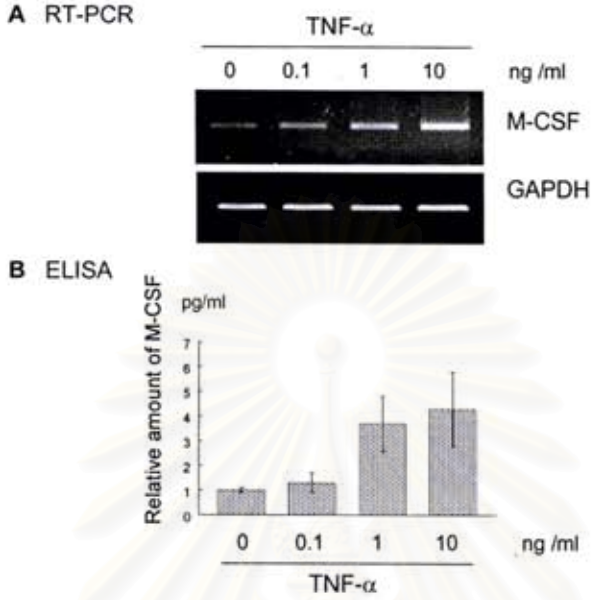

Figure 1

รูปที่ 1 การวิเคราะห์ M-CSF ด้วย RT-PCR และ ELISA รูป 1A เป็นการแสดงออกของ M-CSF ของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การแสดงออกของ M-CSF เพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของ TNF-α รูป 1B เป็นกราฟแสดงปริมาณ M-CSF วิเคราะห์ด้วย ELISA *แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) รูปที่แสดงเป็นผลจากการทดลอง 1 ใน 3 ครั้ง

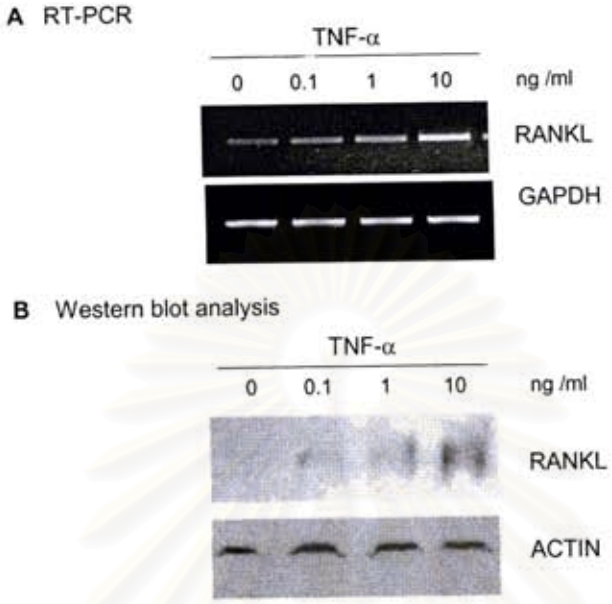

Figure 2

รูปที่ 2 การวิเคราะห์ RANKL ด้วย RT-PCR และเวสเทอร์นบลอท เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การแสดงออกของ RANKL เพิ่มขึ้นเห็นได้ชัดเจนที่ 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (รูป 2A) รูป 2B เป็นผลจากเวสเทอร์นบลอท แสดงการเพิ่มขึ้นของโปรตีนเมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF-α เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แอกตินเป็นตัวควบคุมภายใน

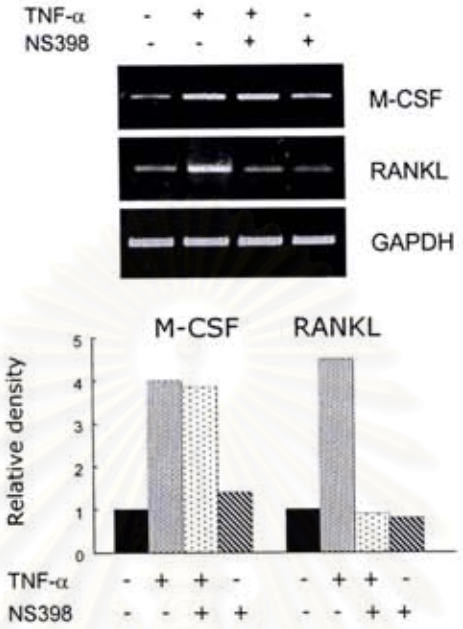

Figure 3

รูปที่ 3 แสดงผลของ NS398 ในการยับยั้งการแสดงออกของ M-CSF และ RANKL NS398 สามารถยับยั้งการแสดงออกของ RANKL แต่ไม่สามารถยับยั้ง M-CSF เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเข้มของ PCR product ด้วย Scion Image analysis software โดยเทียบต่อ GAPDH ที่เท่ากัน แสดงไว้เป็นกราฟ

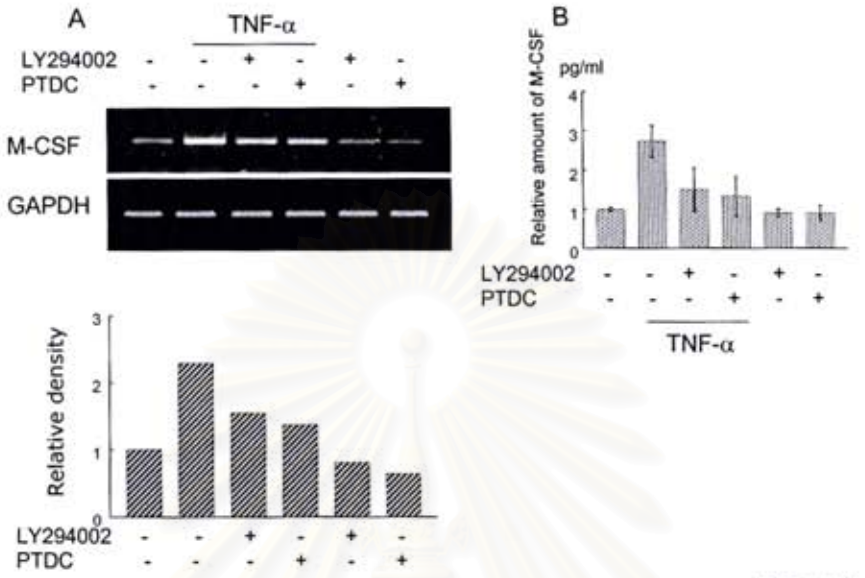

Figure 4

รูปที่ 4 เป็นการวิเคราะห์ M-CSF ในการใช้สารยับยั้ง รูป 4A เป็นภาพการแสดงออกของ M-CSF ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ เมื่อได้รับ TNF-α 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือ LY294002 50 ไมโครโมลาร์, PTDC 50 ไมโครโมลาร์ หรือสารยับยั้งตัวใดตัวหนึ่งร่วมกับ TNF-α เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ความเข้มของผล PCR ด้วย Scion Image analysis กราฟในรูป 4B เป็นปริมาณของ M-CSF ที่วิเคราะห์ด้วย ELISA

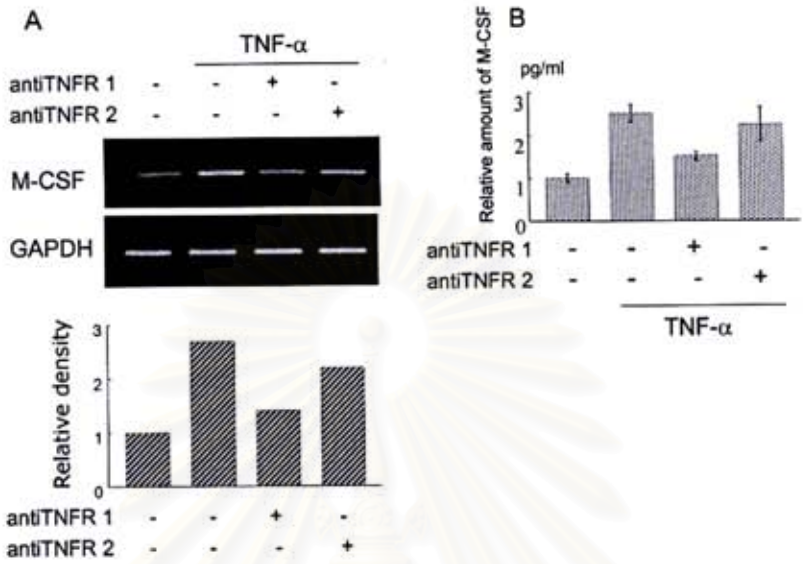

Figure 5

รูปที่ 5 แสดงปริมาณ M-CSF เมื่อเซลล์ได้รับแอนติบอดีต่อ TNFR1 หรือ TNFR2 หรือแอนติบอดีร่วมกับ TNF-α ผลจาก RT-PCR แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีต่อ TNFR1 มีส่วนยับยั้งการกระตุ้นของ TNF-α แต่แอนติบอดีต่อ TNFR2 ไม่สามารถยับยั้งได้ (รูป 5A) กราฟในรูป 5B เป็นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย ELISA

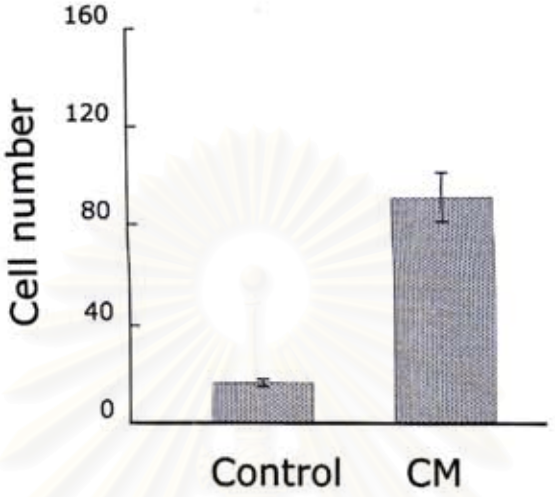

Figure 6

รูปที่ 6 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ RAW264.7 ที่เคลื่อนข้ามเมมเบรนในการตรวจสอบการเคลื่อนของเซลล์ด้วย chemotaxis chamber เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบ พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้น สามารถเหนี่ยวนำการเคลื่อนของเซลล์เป็น 5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

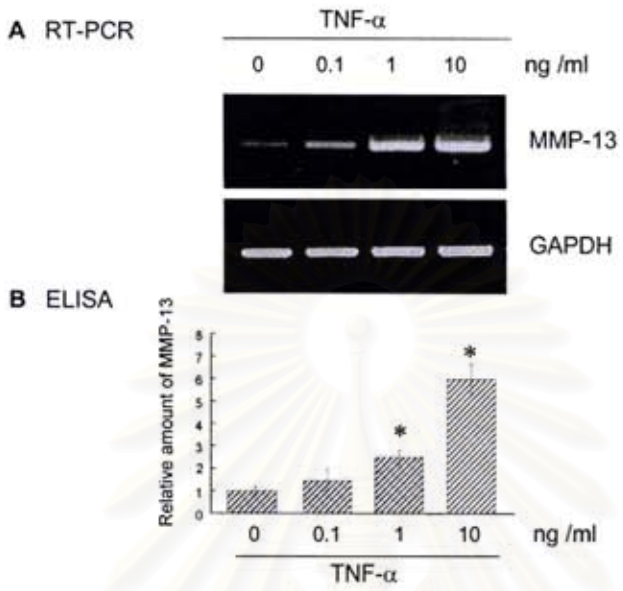

Figure 7

รูปที่ 7 วิเคราะห์การแสดงออกและการสร้างโปรตีนของ MMP-13 ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-α 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การแสดงออกของ MMP-13 เพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของ TNF-α (รูป 7A) รูป 7B เป็นกราฟแสดงปริมาณ M-CSF วิเคราะห์ด้วย ELISA *แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

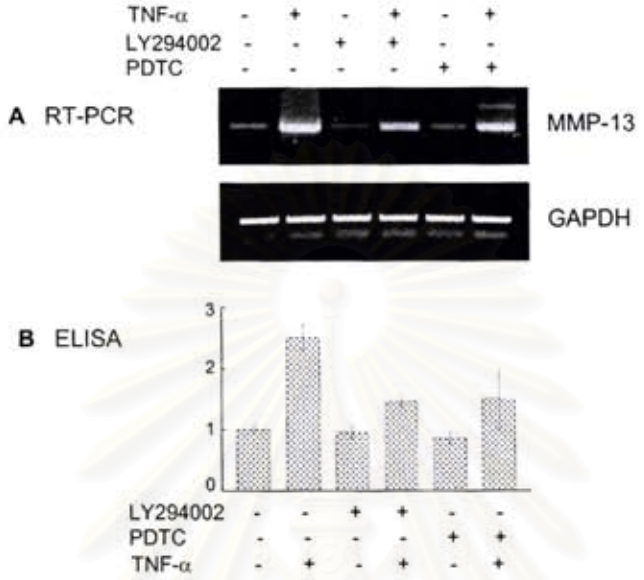

Figure 8

รูปที่ 8 เป็นการวิเคราะห์ MMP-13 ในการใช้สารยับยั้ง รูป 8A เป็นภาพการแสดงออกของ MMP-13 ในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ เมื่อได้รับ TNF-α 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือ LY294002 50 ไมโครโมลาร์, PTDC 50 ไมโครโมลาร์ หรือสารยับยั้งร่วมกับ TNF-α เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กราฟในรูป 8B เป็นปริมาณของ M-CSF ที่วิเคราะห์ด้วย ELISA

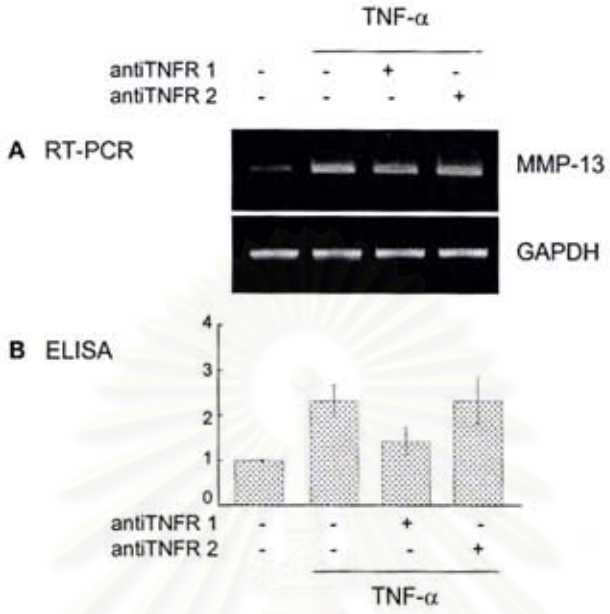

Figure 9

รูปที่ 9 แสดงปริมาณ MMP-13 เมื่อเซลล์ได้รับแอนติบอดีต่อ TNFR1 หรือ TNFR2 หรือแอนติบอดีร่วมกับ TNF-α ผลจาก RT-PCR แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีต่อ TNFR1 มีส่วนยับยั้งการกระตุ้นของ TNF-α แต่แอนติบอดีต่อ TNFR2 ไม่ให้ผลยับยั้ง (รูป 9A) กราฟในรูป 9B เป็นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย ELISA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย