

Project Code (รหัสโครงการ) RMU5080035 Project Period (ระยะเวลาโครงการ) 3 ปี
Project Title (ชื่อโครงการ) การควบคุมการแสดงออกของบีตา-ดีเฟนซิน-2 ของมนุษย์โดยเอนไซม์
ฟอสโฟไลเปสดีและฟอสโฟไลเปสเอช
Investigator (ชื่อนักวิจัย) รศ.ทพ.ดร. สุทธิชัย ฤกษ์ประกรกิจ คณะทันตแพทยศาสตร์ ม. เชียงใหม่
E-mail Address: sutichai@chiangmai.ac.th

บทคัดย่อ

เพ็พไทด์ต้านจุลชีพบีตา-ดีเฟนซิน-2 เป็นส่วนประกอบหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายจุลชีพในหลอดทดลองหลายชนิด และยังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ได้มา ผลการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของบีตา-ดีเฟนซิน-2 สัมพันธ์กับการแปรสภาพของเซลล์เยื่อบุผิวและกระบวนการอักเสบ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงวิถีสื่อสัญญาณภายในเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากของบีตา-ดีเฟนซิน-2 โดยเฉพาะอย่างยิ่งโมเลกุลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแปรสภาพและกระบวนการอักเสบของเซลล์เยื่อบุผิว ได้แก่ เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดี และเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอช ตามลำดับ **วิธีการทดลอง** ประกอบด้วยการวิเคราะห์การแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเออาร์เอ็นเอและโปรตีนในเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากของบีตา-ดีเฟนซิน-2 และเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-9 ซึ่งจัดเป็นส่วนประกอบหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดเช่นเดียวกับบีตา-ดีเฟนซิน-2 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่รีเวอร์ส ทรานสคริปเทสพอลิเมอเรส เรียลไทม์พอลิเมอเรส และเวสเทิร์นบลอตไฮบริไดเซชัน ตามลำดับ นอกจากนี้ วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-9 ด้วยเทคนิคเလာตินไฮโมแกรมอีกด้วย เซลล์เยื่อบุผิวที่เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียชนิดกรัมลบ ได้แก่ พิวโซแบคทีเรียม นิวคลีโอทัม ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์ หรือสารเคมีไฟร์บอลเอสเตอร์ ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ ใช้สารเคมีหลายชนิดที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งจำเพาะโมเลกุลต่าง ๆ ของวิถีสัญญาณที่ต้องการศึกษา ในการตรวจสอบความเกี่ยวข้องของโมเลกุลเหล่านั้นต่อการแสดงออกหรือการทำงานที่เพิ่มขึ้นของบีตา-ดีเฟนซิน-2 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-9 ตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดีและฟอสโฟไลเปสเอชชนิดที่พบในไซโตพลาซึม ทั้งในระดับอาร์เอ็นเออาร์เอ็นเอและโปรตีน และตรวจสอบฤทธิ์ของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดีและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์นี้ **ผลการทดลอง** การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของอาร์เอ็นเออาร์เอ็นเอและโปรตีนของบีตา-ดีเฟนซิน-2 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-9 ถูกยับยั้งโดยตัวยับยั้งจำเพาะต่อเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดีและฟอสโฟไลเปสเอชชนิดที่พบในไซโตพลาซึม นอกจากนั้นยังพบว่ากระตุ้นด้วยสารสกัดจากผนังเซลล์ของพิวโซแบคทีเรียม นิวคลีโอทัม และสารเคมีไฟร์บอลเอสเตอร์ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวช่องปากมีการแปรสภาพเพิ่มมากขึ้น โดยพบการแสดงออกของอาร์เอ็นเออาร์เอ็นเอของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส 1 ที่เพิ่มขึ้น พบการแสดงออกของอาร์เอ็นเออาร์เอ็นเอและโปรตีน

ของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดี 1 และ 2 ในเซลล์เยื่อผิวช่องปาก และพบว่าเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดีทำงานมากขึ้นเมื่อกระตุ้นเซลล์เยื่อผิวช่องปากด้วยตัวกระตุ้นทั้งสองชนิดข้างต้น โดยพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ ซึ่งได้แก่ กรดฟอสฟาติค ในเซลล์เยื่อผิวช่องปากที่ถูกกระตุ้นอีกด้วย นอกจากนั้น พบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสที่คงที่ของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาซึม แต่การแสดงออกของโปรตีนของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาซึมถูกกระตุ้นการทำงานด้วยการเติมกลุ่มฟอสเฟต และมีการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส หลังจากเซลล์เยื่อผิวช่องปากถูกกระตุ้น **สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง** ฟอสโฟไลเปสดีและฟอสโฟไลเปสเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาซึม เป็นโมเลกุลหลักสำคัญในการถ่ายทอดสัญญาณในเซลล์เยื่อผิวช่องปาก ซึ่งควบคุมการแสดงออกของบีตา-ดีเฟนซิน-2 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 นอกจากนี้ ฟอสโฟไลเปสดียังเกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรสภาพของเซลล์เยื่อผิวช่องปากอีกด้วย จึงทำให้เกิดความเชื่อมโยงระหว่างกระบวนการแปรสภาพของเซลล์และระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดด้วยการสร้างเพปไทด์ต้านจุลชีพ **ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต** เป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงบทบาทของบีตา-ดีเฟนซินและเพปไทด์ต้านจุลชีพในครอบครัวอื่น ๆ ต่อการกระตุ้นกระบวนการอักเสบในเซลล์ภูมิคุ้มกันเฉพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อช่องปากต่อไป

Abstract

Human β -defensin-2 (hBD-2) antimicrobial peptide is a component of the innate immunity that exerts its *in vitro* antimicrobial activity against various microorganisms and also activates the acquired immunity. Previous findings showed that hBD-2 expression correlated with epithelial differentiation and inflammatory process. Consequently, the objective of this study was to investigate the signaling pathways of hBD-2 inside oral epithelial cells, particularly molecules involved with epithelial differentiation and inflammation, including phospholipase D (PLD) and phospholipase A₂ (PLA₂). **Methods** included the analyses of mRNA and protein expression in cultured oral epithelial cells for hBD-2 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), another component of innate immunity, by reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, and western blot hybridization, respectively. Moreover, the MMP-9 activity was assayed by gelatin zymogram. Cultured epithelial cells were stimulated with cell wall extract of *Fusobacterium nucleatum*, a Gram-negative periodontal bacterium, or phorbol ester, an epithelial activator. To determine involvement of signaling molecules in hBD-2 and MMP-9 induction, several pharmacological inhibitors specific for each signaling molecule studied were used. We examined mRNA and protein expression for PLD and cytosolic PLA₂, and investigated enzymatic activity of PLD as well as the derived products from an enzymatic reaction. **Results:** HBD-2 and MMP-9 mRNA induction was inhibited by specific inhibitors of PLD and cytosolic PLA₂. In addition, stimulation with cell wall extract of *Fusobacterium nucleatum* and phorbol ester induced oral epithelial differentiation by up-regulating expression of transglutaminase 1 mRNA. It was found that mRNA and protein for PLD1 and PLD2 were expressed in oral epithelial cells, and the enzymatic activity of PLD was increased by the two stimulants. Phosphatidic acid, a product derived from the enzymatic reaction, was also detected in stimulated cells. Furthermore, cytosolic PLA₂ mRNA was constitutively expressed, but its protein was activated by phosphorylation, and the phosphorylated cytosolic PLA₂ then translocated into the nucleus in stimulated epithelial cells. **Summary and Discussion:** PLD and cytosolic PLA₂ are central signaling molecules in regulating hBD-2 and MMP-9 expression in oral epithelial cells. PLD is also involved with epithelial differentiation. Consequently, the connection between cellular differentiation and innate immunity by antimicrobial peptide

production is established. **Suggestions for future study:** It is interesting to further study the roles of β -defensins and antimicrobial peptides of other families in activation of inflammatory process in primary cultured oral cells.

Keywords (คำหลัก): β -defensin-2 (บีต้า-ดีเฟนซิน-2), matrix metalloproteinase-9 (เมทริกซ์ เมทัลโลโปรตีนเอส-9), phospholipase D (ฟอสโฟไลเปสดี), cytosolic phospholipase A₂ (ฟอสโฟไลเปสเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาซึม), differentiation (กระบวนการแปรสภาพ), innate immunity (ระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด)