Project Code (รหัสโครงการ) TRG4580028

Project Title (ชื่อโครงการ) การแสดงออกของแอนติไมโครเบียลเปปไทด์เบต้า-ดีเฟนซินในรอยโรคไลเคนพลานัสในช่องปาก

Investigator (ชื่อนักวิจัย) อ.ดร.ทพ. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ คณะทันตแพทยศาสตร์ ม. เชียงใหม่

E-mail Address: sutichai@chiangmai.ac.th

Project Period (ระยะเวลาโครงการ) 2 ปี

Abstract (บทคัดย่อ)

แอนติไมโครเบียลเปปไทด์เบต้า-ดีเฟนซินเป็นส่วนประกอบหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด ซึ่งออกฤทธิ์ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดลองหลายชนิดและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง ผลการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินสัมพันธ์กับการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เยื่อบุผิวและขบวนการอักเสบ ดังนั้นการศึกษานี้มี**วัตถุประสงค์** 2 ข้อ 1. เพื่อศึกษาถึงบทบาทของแคลเซียมต่อการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในหลอดทดลอง เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าแคลเซียมมีผลต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เยื่อบุผิวและ 2. เพื่อศึกษาถึงความเกี่ยวข้องของเบต้า-ดีเฟนซินกับขบวนการอักเสบ โดยศึกษาการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในรอยโรคไลเคนพลานัส ซึ่งเป็นโรคเรื้อรังของเยื่อบุผิวและผิวหนังที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ **วิธีการทดลอง** ประกอบด้วยการวิเคราะห์การแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสสำหรับเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสามชนิดคือ เบต้า-ดีเฟนซิน-วัน -ทู และ-ทรี ในเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากที่ถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้นของแคลเซียมที่สูงขึ้นทั้งภายนอกและในเซลล์โดยวิธีรีเวอร์ส ทรานสคริพเตส โพลีเมอเรสเชน รีแอคชั่น การแสดงออกในระดับโปรตีนโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์ การศึกษาการแสดงออกของ เบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และ-ทู ในไลเคนพลานัสเทียบกับเยื่อบุผิวปกติที่ปกคลุมเนื้องอกไฟโบรมาโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมิสตรี และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินและอะพอพโตซิส **ผลการทดลอง** อาร์เอ็นเอนำรหัสและโปรตีนของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นโดยความเข้มข้นแคลเซียมที่สูงขึ้นทั้งภายนอกและภายในเซลล์ การเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูถูกยับยั้งอย่างสิ้นเชิงโดยแบพต้า-เอเอ็ม ซึ่งจับกับแคลเซียมภายในเซลล์ การแสดงออกของ เบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และ -ทูเพิ่มขึ้นในไลเคนพลานัสเมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อบุผิวปกติและอยู่ใกล้กับตำแหน่งสายราแคนดิดา พบการทำลายเบสเมนท์เมมเบรนและเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ในเยื่อบุผิวของไลเคนพลานัส ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเบต้า-ดีเฟนซินและขบวนการตายของเซลล์เยื่อบุผิวแบบอะพอพโตซิส และถูกยืนยันโดยการแสดงออกของเอ็นไซม์คาสเปส-ทรี ในรูปแบบที่ถูกกระตุ้นการทำงาน และโพลี (เอดีพี-ไรโบส) โพลีเมอเรสในรูปแบบที่ถูกตัด ถึงแม้ว่าไม่พบการแตกของสารพันธุกรรมออกเป็นท่อนในรอยโรคไลเคนพลานัส **สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง** แคลเซียมเป็นโมเลกุลที่สำคัญในการถ่ายทอดสัญญาณในเซลล์ที่ควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู นอกจากนี้เบต้า-ดีเฟนซินแสดงออกเพิ่มขึ้นในไลเคนพลานัสซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ และสัมพันธ์กับขบวนการอะพอพโตซิสของเซลล์

เยื่อบุผิว **ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต** เป็นที่น่าสนใจว่าแท้ที่จริงแล้วการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในหลอดทดลองผ่านทางโมเลกุลต่างที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอะพอพโตซิสโดยอาศัยแคลเซียมเป็นสื่อหรือไม่

Human β-defensin (hBD) antimicrobial peptides are a component of the innate immunity that exert their *in vitro* antimicrobial activity against various microorganisms and also activate the acquired immunity. Previous findings showed that β-defensin expression correlated with epithelial differentiation and inflammatory process. Consequently, in this study there were two **objectives:** 1) To study the role of calcium in β-defensin expression *in vitro* due to a well-recognized effect of calcium on epithelial differentiation and 2) To determine the involvement of β-defensins with inflammatory process by studying β-defensin expression in lichen planus, which is a chronic mucocutaneous inflammatory disorder. **Methods** include the analysis of mRNA expression for three β-defensins, i.e. hBD-1, hBD-2, and hBD-3, in cultured oral epithelial cells stimulated with increased extracellular and intracellular calcium concentrations by reverse transcriptase polymerase chain reaction, the analysis of protein expression by immunofluorescent, the study of hBD-1 and hBD-2 expression in lichen planus compared with normal epithelium overlying fibroma by immunohistochemistry, and the studies of association between β-defensin expression and apoptosis. **Results:** HBD-2 mRNA and protein were up-regulated by increased concentrations of extracellular and intracellular calcium. Up-regulated hBD-2 was absolutely inhibited by BAPTA-AM that chelates intracellular calcium. Expression of hBD-1 and hBD-2 was up-regulated in lichen planus when compared with normal epithelium and was localized adjacent to Candidal hyphae. Basement membrane was disrupted and T-lymphocytes were present in the epithelial layer of lichen planus, suggesting the association between β-defensins and apoptotic cell death of epithelial cells. These were confirmed by the expression of activated form of caspase-3 and cleaved form of poly (ADP-ribose) polymerase in lichen planus, although DNA fragmentation was not found. **Summary and Discussion:** Calcium is a critical signaling molecule that regulates hBD-2 expression. Moreover, β-defensin expression is up-regulated in lichen planus in association with inflammatory process and epithelial apoptosis. **Suggestions for future study:** It is interesting to determine whether regulation of β-defensin expression *in vitro* is in fact mediated by several molecules associated with apoptosis via calcium as a mediator.

Keywords (คำหลัก): β-defensins (เบต้า-ดีเฟนซิน), calcium (แคลเซียม), lichen planus (ไลเคนพลานัส), apoptosis (อะพอพโตซิส)