TRG4580028 ศ.ทพ. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การแสดงออกของแอนติไมโครเบียลเปปไทด์เบต้า-ดีเฟนซินในรอยโรคไลเคนพลานัสในช่องปาก

Expression of Antimicrobial Peptide β-Defensins in Oral Lichen Planus

โดย ศ.ทพ. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ และคณะ

เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547

สัญญาเลขที่ TRG4580028

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแสดงออกของแอนติไมโครเบียลเปปไทด์เบต้า-ดีเฟนซินในรอยโรคไลเคนพลานัสในช่องปาก

Expression of Antimicrobial Peptide β-Defensins in Oral Lichen Planus

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. อ. ดร. ทพ. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ	คณะทันตแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่
2. ผศ. ทพ. สุรวุฒน์ พงษ์ศิริเวทย์	คณะทันตแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่
3. อ. ทพ. พีรนิธ กันตะบุตร	คณะทันตแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่
4. Prof. Dr. Beverly A. Dale-Crunk	School of Dentistry, University of Washington, Seattle, WA, USA
5. Prof. Dr. Tomas Ganz	Department of Medicine, UCLA, Los Angeles, CA, USA

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาคนไทยคือ อ. ทพ. พีรนิช กันตะบุตร ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และอาจารย์ที่ปรึกษาชาวต่างประเทศทั้ง 2 ท่าน ได้แก่ Professor Dr. Beverly A. Dale-Crunk จาก University of Washington, Seattle, WA, USA ที่ให้คำเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างมากต่อการวางแผนการทดลองต่างๆ และต่อการจัดเตรียม manuscript และ Professor Dr. Tomas Ganz จาก University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA, USA ที่เอื้อเฟื้อแอนติบอดีต่อ hBD-1 และ hBD-2 โดยไม่คิดมูลค่าใดๆ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้ร่วมงานในโครงการวิจัยนี้ ได้แก่ ผศ. ทพ. สุรวุฒน์ พงษ์ศิริเวทย์ ภาควิชาทันตวิทยา-พยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยเหลือข้าพเจ้าอย่างดีตลอดทั้งโครงการในการตัดและอ่านผลชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่คลินิกเวชศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และอาสาสมัครหรือผู้ป่วยที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในโครงการวิจัยนี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณทองคำ ตายะ คุณริสสวัณณ์ กิติกำธร และคุณลักคณา เอี่ยนเหลิง สำหรับความช่วยเหลือทางด้านเทคนิคต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการทำวิจัย อาทิ Immunohistochemistry การถ่ายภาพด้วยเครื่องวิดีทัศน์ นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่สำหรับการทดลอง โดยเฉพาะประธานและกรรมการศูนย์เครื่องมือฯ ทุกท่าน ที่อนุญาตให้ข้าพเจ้าได้ทำการวิจัยที่ศูนย์ฯ แห่งนี้จนเสร็จสิ้นและบรรลุตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ด้วยดี

ข้าพเจ้าขอบคุณทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ หมายเลขที่ TRG 4580028 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนเงินค่าตอบแทนนักวิจัยแก่ข้าพเจ้า สารเคมีและวัสดุที่จำเป็นตลอดทั้งโครงการวิจัย และขอขอบพระคุณ รศ. ทพ. ธีระวัฒน์ โชติกเสถียร ภาควิชาทันตกรรมจัดฟัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยบางส่วนแก่โครงการนี้ และให้กำลังใจข้าพเจ้าในการทำวิจัยตลอดเวลา ท้ายสุดนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับ บิดา มารดา ภรรยา ลูกๆ ที่น่ารักทั้ง 2 คน ตลอดจนสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่เข้าใจถึงความยากลำบากของการเป็นนักวิจัยอาชีพ และให้กำลังใจข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา และขอขอบพระคุณครูบาอาจารย์ทุกท่านที่สอนข้าพเจ้าตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ

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 -ทูเพิ่มขึ้นในไลเคนพลานัสเมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อบุผิวปกติและอยู่ใกล้กับตำแหน่งสายราแคนติตา 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)

บทนำ

บทบาทของเซลล์เยื่อบุผิวในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด

เซลล์เยื่อบุผิวเป็นด่านป้องกันเชื้อโรคที่อยู่บริเวณผิวเยื่อเมือกที่สำคัญ นอกจากนี้เซลล์เยื่อบุผิวยังมีบทบาทในการสร้างและปลดปล่อยสัญญาณซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดไปสู่เซลล์ข้างเคียงทั้งในชั้นเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สัญญาณเหล่านี้ก่อให้เกิดการตอบสนองที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบขึ้นที่บริเวณผิวเยื่อเมือก (Kagnoff and Eckmann, 1997) ดังนั้นบทบาทของเซลล์เยื่อบุผิวในระบบภูมิคุ้มกันจึงมีมากกว่าที่กล่าวไว้ สัญญาณบางอย่างเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและมีฤทธิ์ทำลายเชื้อโรค ซึ่งจำเป็นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคในช่วงแรกก่อนที่ระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังจะเข้ามาทำหน้าที่

แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีประจุบวก

จนถึงปัจจุบันมีแอนติไมโครเบียลเปปไทด์มากกว่าหนึ่งร้อยชนิดที่พบในพืช แมลง ปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Diamond and Bevins, 1998) ดังนั้นจึงเป็นที่ปรากฏว่าแอนติไมโครเบียลเปปไทด์มีอยู่ทั่วๆ ไปในธรรมชาติ และเป็นกลไกระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดซึ่งมีวิวัฒนาการมานานแล้ว โครงสร้างของแอนติไมโครเบียลเปปไทด์มีความหลากหลายมาก แต่จะมีลักษณะที่สำคัญเหมือนๆ กันอยู่ 2 ประการ (Hancock, 1997) คือมีประจุรวมเป็นบวก เนื่องจากพบกรดอะมิโนที่มีประจุบวกอยู่จำนวนมากในโมเลกุล ได้แก่อาร์จินิน และไลซีน และเปปไทด์เหล่านี้ประกอบด้วยทั้งส่วนที่มีขั้ว (ชอบน้ำ) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (กลัวน้ำ) ภายในโมเลกุล หรือเรียกโมเลกุลชนิดนี้ว่า amphipathic ดังนั้นเปปไทด์เหล่านี้จึงสามารถแทรกเข้าไปอยู่ในเยื่อบุผิวของเชื้อแบคทีเรียได้ ทำให้เกิดรูขึ้นบนเยื่อบุผิว และทำให้เยื่อบุผิวไม่สามารถกั้นสารต่างๆ ได้และแบคทีเรียเสียสมดุลย์และตายในที่สุด กลไกนี้ถูกเรียกว่า self-promoted uptake ซึ่งเป็นวิธีการที่แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ใช้ทำลายเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา โดยเฉพาะแคนดิดา การที่แอนติไมโครเบียลเปปไทด์มีประจุรวมเป็นบวกมากๆ ทำให้เปปไทด์เหล่านี้ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเยื่อบุผิวแบคทีเรีย ซึ่งมีไขมันที่มีประจุลบจำนวนมาก โดยที่ปราศจากไขมันที่มีประจุบวกและคลอเลสเตอรอล ซึ่งไม่เหมือนกับเยื่อบุผิวเซลล์มนุษย์ ดังนั้นเปปไทด์เหล่านี้จึงทำลายเฉพาะเซลล์แบคทีเรีย แต่ไม่ทำลายเซลล์ของมนุษย์

ในปัจจุบันนี้แอนติไมโครเบียลเปปไทด์เป็นที่สนใจของนักวิจัยจากบริษัทยาหลายแห่ง เนื่องจากปัญหาของการดื้อยาต่อยาปฏิชีวนะซึ่งกำลังเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ มีการนำเปปไทด์เหล่านี้มาใช้เป็นยาฆ่าเชื้อโรคเนื่องจากฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิดในหลอดทดลอง ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ และเชื้อรา ในปัจจุบันได้มีการทดลองใช้เปปไทด์เหล่านี้ในการรักษาการติดเชื้อต่างๆ ในคลินิก (clinical trials) เช่น IB367 (Intrabiotic, Inc.) ในการรักษาเฉพาะที่บริเวณเยื่อเมือกอักเสบในช่องปาก (oral mucositis) อันเนื่องมากจากการเปลี่ยนถ่ายไขกระดูกที่ต้องมีการใช้ยาที่กดภูมิคุ้มกันร่วมด้วย นอกจากนี้ยังมี Mycoprex (Xoma) ซึ่งใช้ในการรักษาการติดเชื้อราแคนดิดาทางระบบโดยใช้ร่วมกับ fluconazole เพื่อเสริมฤทธิ์กัน ดังนั้นการใช้แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ทั้งในรูปแบบที่ได้จากธรรมชาติหรืออนุพันธ์ของมัน จะเป็นด้วยาใหม่ที่

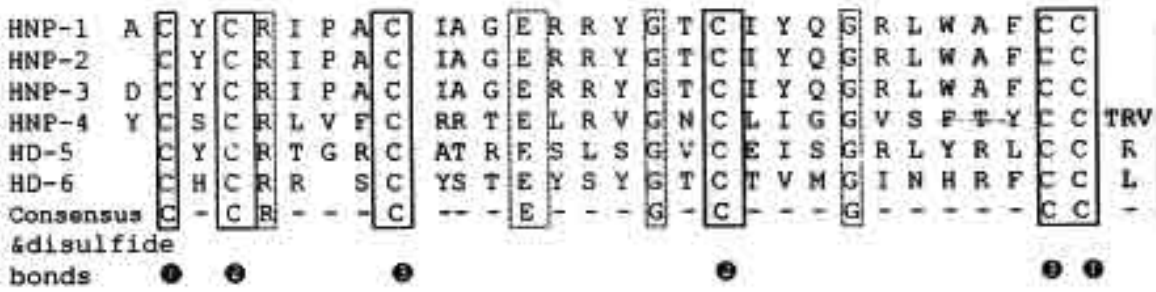
สำคัญในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อในช่องปาก ซึ่งรวมถึงโรคปริทันต์อักเสบ โรคติดเชื้อรา แคนดิดา และ ผิวเยื่อเมือกในช่องปากอักเสบ ต่อไปในอนาคต

อัลฟา- และเบต้า-ดีเฟนซิน

ดีเฟนซินเป็นครอบครัวของแอนติไมโครเบียลเปปไทด์ขนาดใหญ่ที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลเป็น anti-parallel β-sheet พบดีเฟนซินครั้งแรกในเซลล์แมคโครฟาจที่ถุงลมของกระต่าย (Patterson-Delafield *et al.*, 1980; Selsted *et al.*, 1983) และต่อมาก็พบในเซลล์ชนิดอื่นๆ ด้วย ซึ่งรวมถึงเซลล์เยื่อบุผิว ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถแบ่งดีเฟนซินออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ อัลฟา- และเบต้า-ดีเฟนซิน ถึงแม้ว่าดีเฟนซินทั้งสองกลุ่มนี้จะมีความแตกต่างในลำดับของกรดอะมิโนพอสมควร แต่ก็มีความคล้ายคลึงกันบางประการ ได้แก่ มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น anti-parallel β-sheet เหมือนกัน มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อโรคพอๆ กัน และยีนที่กำหนดการสร้างอัลฟา- และเบต้า-ดีเฟนซิน อยู่ใกล้ๆ กันบนโครโมโซมเดียวกันทั้งในจีโนมของมนุษย์และหนู ซึ่งแสดงให้เห็นถึงว่ายีนสองยีนนี้มีวิวัฒนาการร่วมกัน

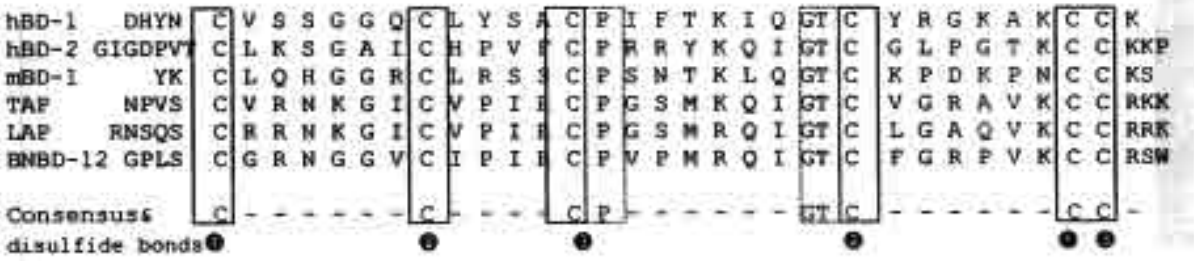
อัลฟา-ดีเฟนซินถูกสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโตรฟิลและแมคโครฟาจของมนุษย์ กระต่าย หนู ซึ่งมีความยาวของกรดอะมิโนตั้งแต่ 29 ถึง 36 ตัว และประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน 6 ตัวเสมอ (รูปที่ 1) ซิสเตอีนทั้ง 6 ตัวจะเชื่อมต่อกับด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะทำให้เกิดโครงสร้างของ anti-parallel β-sheet ที่มีเสถียรภาพ (Kagan *et al.*, 1994) พบอัลฟา-ดีเฟนซินจำนวนมากและประกอบเป็นร้อยละ 5-10 ของโปรตีนทั้งหมดที่สกัดจากเซลล์นิวโตรฟิล (Lehrer *et al.*, 1993) ถึงแม้ว่าเบต้า-ดีเฟนซินจะมีรูปร่างคล้ายกับอัลฟา-ดีเฟนซิน แต่เบต้า-ดีเฟนซินแตกต่างจากอัลฟา-ดีเฟนซินตรงตำแหน่งของกรดอะมิโนซิสเตอีนทั้ง 6 ตัวและการจับคู่กันของซิสเตอีนทั้ง 6 ตัว รูปที่ 1 และ 2 เปรียบเทียบตำแหน่งของกรดอะมิโนซิสเตอีน

รูปที่ 1: Comparison of human α–defensin amino acid sequences. HNP-1 through 4 are α-defensins from human neutrophils. HD-5 and HD-6 are α-defensins from human Paneth cells. Solid boxes highlight the 6 conserved cysteine residues and broken boxes highlight 4 other conserved amino acids. HD-6 is shown with a gap between the second and third cysteine residues to maximize alignment.



รูปที่ 2: Comparison of β–defensin amino acid sequences. Human β-defensin-1 (hBD-1) is from various sites including gingival epithelial cells (Krisanaprakornkit *et al.*, 1998). Human

β-defensin-2 (hBD-2) is from psoriatic scale cells and airway epithelial cells (Harder *et al.*, 1997; Bals *et al.*, 1998b) and gingival epithelial cells (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000). Mouse β-defensin-1 (mBD-1) is from tracheal epithelium (Bals *et al.*, 1998a). Tracheal antimicrobial peptide (TAP) is from bovine tracheal epithelium (Diamond *et al.*, 1991). Lingual antimicrobial peptide (LAP) is from bovine tongue (Schonwetter *et al.*, 1995). BNBD-12 is from bovine neutrophils (Selsted *et al.*, 1993). Solid boxes highlight the 6 conserved cysteine residues and broken boxes highlight 3 other conserved amino acids.



สมาชิกตัวแรกของเบต้า-ดีเฟนซินคือ tracheal antimicrobial peptide (TAP) ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกโดย Diamond และคณะในปี 1991 ในเซลล์คอลัมน่าร์ของเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมของวัว สมาชิกตัวที่สองชื่อว่า lingual antimicrobial peptide (LAP) ซึ่งพบในเซลล์เยื่อบุผิวของลิ้นวัว (Shonwetter *et al.*, 1995) ในมนุษย์พบเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน (hBD-1) จากการวิเคราะห์ hemofiltrate ที่ได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคไตวายขั้นสุดท้าย (Bensch *et al.*, 1995) ต่อมาพบการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันในเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ตับอ่อน ไต ต่อมน้ำลาย ต่อมลูกหมาก รก อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศหญิง (Zhao *et al.*, 1996; Valore *et al.*, 1998) และในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก (Krisanaprakornkit *et al.*, 1998) เบต้า-ดีเฟนซิน-วันปริมาณมากถูกสกัดได้จากปัสสาวะและเยื่อเมือกบริเวณปากมดลูก แสดงให้เห็นว่าระบบสืบพันธุ์และขับถ่ายของเสียเป็นแหล่งที่มีการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินที่สำคัญ (Valore *et al.*, 1998) ขนาดของเบต้า-ดีเฟนซินมีความยาวของกรดอะมิโน 36 ตัว และประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีนจำนวน 6 ตัว ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมือนๆ กันในครอบครัวเบต้า-ดีเฟนซิน (รูปที่ 2)

การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันในเซลล์เยื่อบุผิวของมนุษย์เป็นแบบ constitutive (Krisanaprakornkit *et al.*, 1998) ในขณะที่ระดับของการแสดงออกมีความแตกต่างกันค่อนข้างมากในแต่ละคน (Valore *et al.*, 1998; Krisanaprakornkit *et al.*, 1998) ผลการทดลองด้วยการใช้เทคนิค *in situ* hybridization แสดงให้เห็นถึงตำแหน่งของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันในเซลล์เคอราติโนซัยท์ชั้นซูปราเบซิลของผิวหนัง เยื่อบุผิวเหงือก (Fulton *et al.*, 1997; Dale *et al.*, 2001) เบต้า-ดีเฟนซิน-ทูถูกสกัดจากผิวหนังที่เป็นโรคเรื้อนกวาง (psoriasis) (Harder *et al.*, 1997) และในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและเนื้อเยื่อในช่องปาก (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในเซลล์เยื่อบุผิวของปอดส่วนต้น ในลำไส้เล็กและใหญ่ ในตับอ่อน ในเต้านม และในเยื่อบุผิวช่องปาก (Bals *et al.*, 1998b; *Dale et al.*, 2001) พบว่าในขณะที่เบต้า-ดีเฟนซิน-วันแสดงออกแบบ constitutive เบต้า-ดีเฟนซิน-ทู แสดงออกน้อยมากในผิวหนังปกติ แต่จะ

ถูกกระตุ้นให้แสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์เคอราติโนซัยท์ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวก เชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ และสารก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น ทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา (Harder *et al.*, 1997) นอกจากนี้การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นด้วยสารสกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อ *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) ซัยโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบและ phorbol ester (PMA) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวที่มีฤทธิ์มาก (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000) เมื่อไม่นานนี้ทั้งเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีฟนซิน-ทู เปปไทด์ถูกสกัดพบได้จากอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวที่ถูกเพาะเลี้ยงและของเหลวร่องเหงือก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ทั้งสองตัวนี้ถูกสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์จริงๆ (Diamond *et al.*, 2001) ถึงแม้ว่าเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูคล้ายคลึงกับเบต้า-ดีเฟนซิน-วันประมาณ 39% (รูปที่ 2) แต่เปปไทด์ทั้งสองตัวนี้มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อโรคได้หลายชนิดในหลอดทดลอง (Valore *et al.*, 1998; Bals *et al.*, 1998b) ได้ใกล้เคียงกันจากการเปรียบเทียบค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อเร็วๆ นี้พบการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทรีและเบต้า-ดีเฟนซิน-โฟร์ในมนุษย์ (Harder *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2001) อาร์เอ็นเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเมสเซนเจอร์ของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทรีถูกกระตุ้นให้แสดงออกเพิ่มขึ้นโดยทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา และเชื้อแบคทีเรียในเซลล์เคอราติโนซัยท์เพาะเลี้ยงและเซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินหายใจ แสดงให้เห็นว่าเบต้า-ดีเฟนซิน-ทรีมีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด บริเวณเยื่อบุผิวหนังและที่ปอด การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน ของมนุษย์ในบริเวณชั้นเยื่อบุผิวของหลายๆ อวัยวะ และที่ผิวหนังแสดงให้เห็นถึงบทบาทของเปปไทด์เหล่านี้ในการป้องกันเชื้อโรค พบว่าโรคซิสติค ไฟโบรซิส (cystic fibrosis) เป็นโรคแรกที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับความผิดปกติในการทำงานของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และ เบต้า-ดีเฟนซิน-ทู (Goldman *et al.*, 1997; Bals *et al.*, 1998b) เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นบริเวณทางเดินหายใจของผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์ ซึ่งทำให้ผู้ป่วยที่เป็นซิสติค ไฟโบรซิสมีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สูงขึ้นมาก ความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยเป็นผลมาจากความผิดปกติที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมของ cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) transporter

บทบาทของเบต้า-ดีเฟนซินของมนุษย์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและได้รับภายหลัง

นอกจากบทบาทของเบต้า-ดีเฟนซินในการทำลายเชื้อโรคแล้ว พบว่าเบต้า-ดีเฟนซินยังมีฤทธิ์ในการชักนำเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเข้ามา หรือที่เรียกว่า คีโมแทคติค (chemotactic) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงหน้าที่ใหม่ของเบต้า-ดีเฟนซิน โดยเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและที่ได้รับภายหลัง พบว่าเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์สามารถชักนำเซลล์เดนดริติก และกระตุ้นการเคลื่อนที่ของ memory CD45RO/CD4 ที-ลิมโฟซัยท์ (Yang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1999) นอกจากนี้เบต้า-ดีเฟนซิน-ทูยังกระตุ้นการสร้างพรอสตาแกลนดิน อีทูและการปลดปล่อยฮิสตามีนจากแมสท์เซลล์อย่างมาก (Niyonsaba *et al.*, 2001) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของเปปไทด์

เหล่านี้ในขบวนการอักเสบ จึงเห็นได้ว่าเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์มีส่วนร่วมในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งสองระบบ

บทบาทของแคลเซียมในการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน

หลายๆ การศึกษาแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินและการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ของเซลล์เยื่อบุผิว เช่น ตำแหน่งของอาร์เอ็นเอ่รหัสของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในเซลล์เคอราติโนซัยท์ชั้นซูปราเบซิล (Fulton *et al.*, 1997; Dale *et al.*, 2001) นอกจากนี้พบเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูแสดงออกมากขึ้นในเซลล์เคอราติโนซัยท์ของผิวหนังที่มีขนาดเซลล์ใหญ่และมีการเปลี่ยนสภาพไปแล้ว (Liu *et al.*, 2002) ตำแหน่งของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเปปไทด์อยู่ในชั้นบนๆ ของเยื่อบุผิว ซึ่งจะสอดคล้องกับบทบาทของเปปไทด์เหล่านี้ในการทำหน้าที่เป็นด่านต่อต้านเชื้อโรค (Ali *et al.*, 2001; Dale *et al.*, 2001) แคลเซียมมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เยื่อบุผิว เซลล์เคอราติโนซัยท์ที่เลี้ยงในความเข้มข้นต่ำของแคลเซียมจะแบ่งตัว แต่เมื่อเปลี่ยนไปเลี้ยงในความเข้มข้นของแคลเซียมที่สูงขึ้น เซลล์เคอราติโนซัยท์จะหยุดการแบ่งตัวและมีการแสดงออกของตัวบ่งชี้ของการเปลี่ยนสภาพ เช่น อินโวลูคริน เคอราตินชนิดที่ 1 และ 10 ลอริคริน และโปรฟิลแลกกริน (Yuspa *et al.*, 1989) แคลเซียมยังกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ ทรานสกลูตามิเนส ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างคอร์นิฟายด์ เอนเวลอพ (Polakowska and Goldsmith, 1991; Missero *et al.*, 1996) บทบาทของแคลเซียมในการเปลี่ยนสภาพในเนื้อเยื่อเห็นได้ชัดจากการปรากฏของ calcium gradient ในผิวหนังคือระดับของแคลเซียมเพิ่มขึ้นจากชั้นแบเซิลไปจนถึงชั้นแกรนูล่า (Menon and Elias, 1991) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินซึ่งมีความสัมพันธ์กับขบวนการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ จะถูกควบคุมโดยแคลเซียมซึ่งควบคุมการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ **ในการศึกษานี้ทางคณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าแคลเซียมน่าจะเป็นโมเลกุลที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในหลอดทดลอง**

ความเกี่ยวข้องของเบต้า-ดีเฟนซินในรอยโรคไลเคนพลานัส

โรคไลเคนพลานัสเป็นโรคที่เกิดขึ้นบริเวณผิวเยื่อเมือกและผิวหนังที่พบได้ค่อนข้างบ่อย ประมาณตั้งแต่ร้อยละ 0.1 จนถึง 4 ขึ้นอยู่กับประชากรที่ศึกษา (Scully *et al.*, 1998) ไลเคนพลานัสเป็นโรคที่พบในวัยกลางคนจนถึงคนสูงอายุ และพบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย 2 เท่า (Sklavounou and Laskaris, 1983) ลักษณะทางคลินิกของไลเคนพลานัสประกอบด้วย ลายเส้นสีขาวซึ่งมักจะเป็นทั้งสองข้าง โดยพบมากที่เยื่อบุกระพุ้งแก้มด้านหลัง (ประมาณร้อยละ 90 ของรอยโรคทั้งหมด) บนลิ้น (ประมาณร้อยละ 30) และบนสันเหงือกหรือเหงือก (ประมาณร้อยละ 13) ลักษณะรอยโรคชนิดฝอลึบหรือเป็นแผลจะทำให้ผู้ป่วยรู้สึกปวดแสบปวดร้อน (Thorn *et al.*, 1988) และเป็นอาการนำที่ทำให้ผู้ป่วยมาพบทันตแพทย์ โดยพบประมาณร้อยละ 43 ถึง 91 ของผู้ป่วยที่เป็นไลเคนพลานัสทั้งหมด (Scully *et al.*, 1998) นอกจากนี้มักจะพบว่ามีการติดเชื้อราแคนดิดาบริเวณรอยโรคร่วม

ด้วยเสมอ โดยเฉพาะรอยโรคชนิดฝ้อลีบหรือเป็นแผล (Hatchuel *et al.*, 1990) มีรายงานบ เงราย งานพบว่าโรคไลเคนพลานัสสามารถเปลี่ยนไปเป็นมะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนม่าได้ โดยพบประมาณร้อยละ 0.4 ถึง 3.3 ขึ้นอยู่กับการศึกษา (Scully *et al.*, 1998) และพบว่าไลเคน พลานัสชนิดฝ้อลีบหรือเป็นแผลถลอกที่บริเวณลิ้นและเหงือกมักจะเป็นตำแหน่งที่เสี่ยงต่อการ เปลี่ยนไปเป็นโรคมะเร็งมากที่สุด (Barnard *et al.*, 1993) ดังนั้นการเฝ้าระวังและติดตามโรคไล เคนพลานัสจึงเป็นสิ่งสำคัญ

พยาธิกำเนิดของไลเคนพลานัสยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่น่าจะมาจากหลายปัจจัยร่วมกัน คือปัจจัยที่มาจากผู้ป่วยเองและปัจจัยสิ่งแวดล้อม สำหรับปัจจัยที่มาจากผู้ป่วยคาดว่าน่าจะเกิด ความผิดปกติของกลไกของระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เป็นสื่อโดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวที-ลิม โฟซัยท์ ที่ทำลายเบสเมนท์เมมเบรนที่กั้นระหว่างเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันให้ขาดออกและนอก จากนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที-ลิมโฟซัยท์ยังเข้าไปทำลายเซลล์เยื่อบุผิวให้ตายด้วยขบวนการอะพอพ โตซิส (Sugerman *et al.*, 2002) โดยมีสาเหตุทั้งจากภายในและภายนอกอื่นๆ ร่วมด้วย แต่ถึงอย่าง ไรก็ตามปัจจัยที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคไลเคนพลานัสก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Walsh *et al.*, 1990) และนอกจากนี้กลไกในการเกิดโรคที่แน่ชัดก็ยังไม่ชัดเจน นอกจากจะมีสมมติฐานที่ถูกตั้งขึ้น มาเพื่อใช้อธิบายเท่านั้น (Sugerman *et al.*, 2002) เป็นไปได้ว่ามีสารจากภายนอก หรือยา หรือเชื้อ โรคมากระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิว ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวสร้างซัยโตคายน์ มีการนำเสนอสิ่งแปลกปลอมนี้บน โมเลกุล เอ็มเอชซี คลาสทู มีการสร้างและปลดปล่อยสารต่างๆ จำนวนมากเช่นเบต้า-ดีเฟนซินเปป ไทด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบและยังมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์เดนดริ ติกและที-ลิมโฟซัยท์ให้เข้ามาอยู่ครงรอยโรค (Yang *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะพบการ แสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์ในรอยโรคไลเคนพลานัสซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการ อักเสบเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ และนอกจากนี้อาจเป็นไปได้ที่เบต้า-ดีเฟนซินที่แสดงออก เพิ่มขึ้นมีส่วนร่วมในพยาธิกำเนิดของไลเคนพลานัสด้วย **ในการศึกษานี้ ทางคณะผู้วิจัยได้ตั้ง สมมติฐานว่ามีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ในรอยโรคไลเคนพลานัส และน่าจะอยู่ใกล้กับบริเวณที่มีการติดเชื้อราแคนดิดาในรอยโรค นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองตัวนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับขบวนการอะพอพ โตซิสที่เกิดขึ้นในเซลล์เยื่อบุผิวในรอยโรคไลเคนพลานัสด้วย**

วัสดุและวิธีการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิว

เซลล์เยื่อบุผิวช่องปากถูกแยกออกมาจากเนื้อเยื่อเหงือกซึ่งปกคลุมฟันกรามตุดซี่ที่สาม (Krisanaprakornkit *et al.*, 1998) ซึ่งขั้นตอนในการนำเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยมาทดลองได้ผ่านคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์และสวัสดิภาพของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เซลล์เยื่อบุผิวถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชื่อ keratinocyte growth medium (Biowhittaker Inc., Walkersville, MD, USA) ซึ่งประกอบด้วยความเข้มข้นต่ำของแคลเซียม (0.03 mM) หลังจากที่เซลล์แบ่งตัวเกือบเต็มจานเพาะเลี้ยง (ประมาณร้อยละ 80) เซลล์เยื่อบุผิวถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *Fusobacterium nucleatum* ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml หรือแคลเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.03, 0.06, 0.15, 0.60 และ 1.2 mM หรือ thapsigargin (Sigma, St. Louis, MO, USA) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 หรือ 1000 nM เป็นเวลาต่างๆ กันคือ 1, 3, 6, 12, 18 หรือ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ในบางการทดลองยังใช้สารเคมีชื่อ BAPTA-AM (Sigma) ซึ่งจับกับแคลเซียมภายในเซลล์ ที่ความเข้มข้น 10 หรือ 30 µMในการกระตุ้นเซลล์ก่อนที่จะกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นดังกล่าวข้างต้น ขั้นตอนในการสกัดสารสกัดจากผนังแบคทีเรียถูกอธิบายไว้ใน Krisanaprakornkit *et al.*, 1998

การสกัดอาร์เอ็นเอและ RT-PCR

อาร์เอ็นเอถูกสกัดโดย TRIZOL LS reagent (Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) วัดปริมาณของอาร์เอ็นเอในตัวอย่างด้วยวิธี optical density ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ใช้วิธี RT-PCR ในการตรวจวัดการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินอาร์เอ็นเอนำรหัส ใช้อาร์เอ็นเอประมาณ 3 ไมโครกรัมในการสังเคราะห์ cDNA ด้วย SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Life Technologies, Inc.) ทำการขยาย cDNA ด้วยวิธี PCR ใน Mastercycler Gradient thermal cycler (Eppendorf, Germany) จำนวน 28 รอบ ตามขั้นตอนดังนี้ 1) 30 วินาที ที่ 95°C 2) 30 วินาที ที่ 60° หรือ 65°C และ 3) 1 นาที ที่ 72°C ตารางที่ 1 แสดงถึงลำดับนิวคลิโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการขยายสารพันธุกรรมสำหรับเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน เบต้า-ดีเฟนซิน-ทู เบต้า-ดีเฟนซิน-ทรี อินเตอร์ลิวคิน-8 และ GAPDH ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR ถูกนำมาแยกบนวุ้นอะกาโรส ใน 1X TBE และย้อมดูแถบของสารพันธุกรรมด้วย ethidium bromide รูปภาพของวุ้นถูกถ่ายด้วยกล้อง CCD ที่ติดกับ Gel Documentation 1000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบสารพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Molecular Analyst software version 1.4

Immunolocalization ของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู

เพื่อที่จะตรวจหาการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเปปไทด์ เซลล์เยื่อบุผิวถูกเลี้ยงอยู่บน coverslips และถูกกระตุ้นด้วย 1.20 mM แคลเซียม หรือ 1000 nM thapsigargin หรือสารสกัดจาก

ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *Fusobasterium nucleatum* หรือทิ้งไว้โดยไม่ถูกกระตุ้น หลังจากนั้นจะทำการตรึงสภาพของเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde ใน Sorensen's buffer และใช้ cold acetone เจาะรูเซลล์บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ปิดกั้นการจับแบบไม่เฉพาะเจาะจงด้วย 3% normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) เป็นเวลา 20 นาที และ incubate กับ polyclonal antibody ต่อเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ที่ความเข้มข้น 1:500 หรือ preimmune rabbit serum หลังจากนั้นทำการล้าง และ incubate กับ FITC-conjugated secondary goat anti-rabbit (Vector Laboratories) ที่ความเข้มข้น 1:200 เป็นเวลา 30 นาที ล้างและ mount ด้วย Fluorescence Mounting Medium (DAKO, Glostrup, Denmark) ทำการบันทึกภาพด้วย 3-CCD color video camera (JVC, Japan) ที่ติดอยู่กับกล้องฟลูออเรสเซนท์ (Olympus, Japan)

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลิโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

Primer	Sequence (5'-3')
HBD-1 (forward)	ATG AGA ACT TCC TAC CTT CTG CT
HBD-1 (reverse)	TCA CTT GCA GCA CTT
HBD-2 (forward)	CCA GCC ATC AGC CAT GAG GGT
HBD-2 (reverse)	GGA GCC CTT TCT GAA TCC GCA
HBD-3 (forward)	TGA AGC CTA GCA GCT ATG AGG
HBD-3 (reverse)	AGC ACT TGC CGA TCT GTT CCT
IL-8 (forward)	TTT CTG ATG GAA GAG AGC TCT GTC TGG
IL-8 (reverse)	AGT GGA ACA AGG ACT TGT GGA TCC TGG
GAPDH (forward)	ACC ACA GTC CAT GCC ATC ACT GC
GAPDH (reverse)	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG C

การตรึงสภาพเนื้อเยื่อ

ตรึงสภาพเนื้อเยื่อใน neutral buffered formalin (Sigma) เป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นแช่ใน 70% ETOH และหลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนต่างๆ เพื่อ embed ในพาราฟินบล็อค

เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสตรี ด้วยวิธี ABC

1. Deparaffinize in xylene/rehydrate sections sequentially from 100% ETOH to 70% ETOH.
2. Equilibrate in TBS to remove alcohol, then transfer into water.
3. Unmask the antigen in an antigen unmasking solution (Vector Laboratories) with heat
4. Block endogenous peroxidase with 0.75% H_2O_2 for 30 min.

5. Preincubate with 3% normal serum of the species used to produce the secondary antibody.
6. Incubate with primary antibody (anti-hBD-1, anti-hBD-2, anti-laminin [Sigma], anti-CD45RO [UCHL1; Dako], anti-active caspase-3 [Oncogene Research Product], or anti-cleaved PARP [Cell Signaling]) in TBS (dilution buffer for primary antibody may differ among different types of antibodies) overnight at 4°C in a humidified box. The dilution of the antibodies varies depending on the type of antibody.
7. Incubate in secondary antibody for 1 h using biotinylated secondary antibody (Vector).
8. Rinse twice in TBS (5 min each).
9. Incubate in ABC reagent (Vector Elite) for 45 min.
10. Rinse twice in TBS (5 min each), and rinse once (5 min) in Tris buffer (0.05 M Tris pH 7.4-7.6).
11. Prepare the DAB solution (Sigma).
12. Color reaction is with DAB as substrate. Add the DAB solution dropwise to sections. Incubate 3-9 min. Monitor the color reaction by observing the positive controls.
13. Gently rinse the DAB into a collection bottle with a water squirt bottle.
14. Dehydrate by going back through ETOH washes.
15. Clear in toluene and coverslip.

เทคนิค Imprint cultures

The method of Arendorf and Walker, 1980, is used for imprint culture. Sterile foam pads (2.5 x 2.5 cm) are dipped in Sabouraud's broth and pressed against the lesion for 60 seconds. The foam pad is then pressed firmly on Sabouraud's agar plate and then transferred to the laboratory. The foam pad is left in place for 8 h at 37°C and aseptically removed and then incubated for a further 48 h at 37°C. The number of colonies grown on the plate at each site is counted and expressed per unit area sampled. This method is a sensitive and reliable method to locally detect Candida at the lesion.

เทคนิค Periodic Acid Schiff Staining (McManus' method, 1948)

Fixation in 10% neutral buffered formalin. Cut paraffin section at 6 μm.

Staining procedure

1. Deparaffinize and hydrate to MQ water.
2. Oxidize in periodic acid solution for 5 min.
3. Rinse in MQ water.

4. Coleman's Feulgen solution for 15 min.
5. Wash in running water for 10 min for pink color to develop.
6. Light green counterstain for a few seconds.
7. Dehydrate in 95% alcohol, absolute alcohol, and clear in xylene, two changes each.
8. Mount with Permount.

เทคนิค *In Situ* TUNEL assay

ใช้ชุดตรวจ *In Situ* Apoptosis Detection kit (TACS.XL-DAB) ของบริษัท Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD, USA ในการตรวจหา DNA fragmentation ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งของขบวนการอะพอพโตซิสในชิ้นเนื้อที่ถูกตัดลงบนสไลด์ วิธีการทำเริ่มต้นด้วยการอุ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่ 57°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจุ่มสไลด์ในไซลีน (xylene) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และแช่ในแอลกอฮอล 100%, 95% และ 70% ตามลำดับ ครั้งละ 5 นาที หลังจากนั้นแช่สไลด์ใน 1X PBS สองครั้งๆ ละ 5 นาที เติม proteinase K ลงบนสไลด์ประมาณ 50 µl อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย deionized water สองครั้งๆ ละ 2 นาที แช่สไลด์ใน Quenching solution ซึ่งประกอบด้วยเมธานอล และ 30% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วย 1XPBS เป็นเวลา 1 นาที ต่อมาแช่สไลด์ใน 1X TdT labeling buffer เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม Labeling reaction mix ปริมาณ 50 µl บนชิ้นเนื้อ ซึ่งประกอบด้วย BrdU-dNTP mix, TdT Enzyme 1X TdT labeling buffer และอบไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในสไลด์ควบคุมจะใช้สไลด์จากชิ้นเนื้อเดียวกันแต่เติม nuclease เพื่อทำลายสารพันธุกรรมให้แตกออกเป็นท่อนซึ่งจะเป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก เพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจในการตรวจหาการแตกออกของสารพันธุกรรมในชิ้นเนื้อ

หลังจากอบไว้ 1 ชั่วโมง ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 1X TdT stop buffer เป็นเวลา 5 นาที และล้างสไลด์ 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที ด้วย 1X PBS เติม antibody solution ซึ่งประกอบด้วย Anti-BrdU ปริมาณ 50 µl ลงไปบนชิ้นเนื้อและอบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย 1X PBS-Tween 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที เติม 50 µl ของ Strep-HRP solution และแช่ทิ้งไว้ 10 นาที ล้างด้วย 1X PBS 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที แช่ใน DAB solution เป็นเวลา 2-7 นาที แล้วล้างใน deionized water 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที ทำการ Counterstain ใน methyl green เป็นเวลา 3 นาที แล้วทำการ dehydrate ชิ้นเนื้อด้วยเอธานอล แล้วแช่ในไซลีน 2 ครั้ง ทำการ mount ชิ้นเนื้อ ด้วย coverslip และ mounting medium

ผลการทดลอง

บทบาทของแคลเซียมต่อการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู

พบว่าการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นโดยระดับแคลเซียมที่สูงขึ้นภายนอกเซลล์ (0.60 และ 1.20 mM) (รูปที่ 3A) ประมาณ 3 และ 4 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในเซลล์ที่เลี้ยงในความเข้มข้นแคลเซียมต่ำ (0.03 mM) (รูปที่ 3B) ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทรีไม่ได้เพิ่มขึ้นจากความเข้มข้นของแคลเซียมที่สูงขึ้น (รูปที่ 3A) นอกจากนี้ thapsigargin ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้แคลเซียมถูกปลดปล่อยออกมาจากที่เก็บไว้ภายในเซลล์ กระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น (รูปที่ 3C) การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้น 3, 4 และ 5 เท่าในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย thapsigargin ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1000 nM ตามลำดับ (รูปที่ 3D) แต่อย่างไรก็ตาม เบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทรีไม่ถูกกระตุ้นโดย thapsigargin (รูปที่ 3C) การแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของอินเตอร์ลิวคิน-8 ถูกกระตุ้นโดยความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่สูงขึ้นและ thapsigargin (รูปที่ 3A และ 3C) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจากการศึกษาโดย Yu และคณะ ปี 2001 ในเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ใหญ่

จากการศึกษาจลนศาสตร์ของการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู พบว่าการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดย thapsigargin เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วประมาณ 1-3 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้น (รูปที่ 4B) โดยที่เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าในช่วงสามชั่วโมงแรก (รูปที่ 4C) ในขณะที่การเพิ่มขึ้นโดยแคลเซียมใช้เวลานานกว่าคือประมาณ 12 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้น (รูปที่ 4A) ผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูผ่านทางเส้นทางสื่อสัญญาณภายในเซลล์หลายๆ เส้นทาง ซึ่งก็คล้ายกับผลการทดลองโดย Krisanaprakornkit และคณะ ปี 2002 ที่พบว่าเส้นทางสื่อสัญญาณที่มีชื่อว่า mitogen activated protein kinase ทั้ง 3 เส้นทางเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู

จากการศึกษาเมื่อไม่นานนี้พบว่า lipopolysaccharide (LPS) กระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ในเซลล์เยื่อบุผิวทางเดินหายใจของมนุษย์โดยผ่านทางการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์ (Tomita *et al.*, 2002) ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาว่าระดับแคลเซียมภายในเซลล์ที่สูงขึ้นมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากหรือไม่ จากการศึกษาพบว่า BAPTA-AM ซึ่งเป็นสารเคมีที่สามารถจับกับแคลเซียมภายในเซลล์ สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดยสารสกัดของผนังเซลล์ของ *Fusobacterium nucleatum* หรือโดย thapsigargin หรือโดยความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่สูงขึ้นอย่างสิ้นเชิงที่ความเข้มข้นของ BAPTA-AM ที่ 30 μM (รูปที่ 5) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นชัดว่าการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดยส่วนประกอบของแบคทีเรีย ระดับแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่สูงขึ้น และ thapsigargin ขึ้นอยู่กับการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากแหล่งที่เก็บในเซลล์

นอกจากอาร์เอ็นน่ารหัสของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูที่เพิ่มขึ้นแล้ว ยังพบว่าเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเปปไทด์ถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นในเซลล์เยื่อบุผิวที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากผนังเซลล์ของ *Fusobacterium nucleatum* แคลเซียม และ thapsigargin (รูปที่ 6B, 6D และ 6E ตามลำดับ) การย้อมติดสีเขียว (FITC) ของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเปปไทด์แสดงให้เห็นการกระจายของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในซัยโต พลาซึมของเซลล์ (ลูกศร) แต่ไม่พบการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเปปไทด์ในทุกๆ เซลล์ (หัวลูกศร) อาจเป็นเพราะเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเปปไทด์สร้างในบางกลุ่มเซลล์เท่านั้น ไม่พบการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเปปไทด์ในเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น (รูปที่ 6A) และไม่พบการย้อมติดสีของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเปปไทด์ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากผนังเซลล์ แต่ใช้ preimmune rabbit serum แทน antibody ต่อเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู (รูปที่ 6C)

การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในไลเคนพลานัสในช่องปาก

จากการทดลองในหลอดทดลอง พบว่าการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน โดยเฉพาะเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในเนื้อเยื่อโดยเฉพาะในโรคไลเคนพลานัสที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ และพบได้ค่อนข้างบ่อยในคลินิกทันตกรรม โดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมิสตรีในการศึกษาการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Tomas Ganz, UCLA สำหรับแอนติบอดีต่อเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์ทั้งสองตัวนี้ ผลการทดลองพบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน (รูปที่ 7A) และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู (รูปที่ 7C) ในรอยโรคไลเคนพลานัส เมื่อเปรียบเทียบกับไม่พบการแสดงออกของเปปไทด์ทั้งสองตัวนี้ในเยื่อบุผิวกระพุ้งแก้มปกติที่ได้จากโรคไฟโบรมา (รูปที่ 7I และ 7J) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์ทั้งสองตัวนี้ในรอยโรคโครนิคฮัยเปอร์พลาสติก แคนดิเดียซิส (Chronic Hyperplastic Candidiasis) ที่เกิดจากการติดเชื้อราแคนดิดา (รูปที่ 7E และ 7G) ไม่พบการติดสีย้อมของเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์ทั้งสองตัว เมื่อใช้ preimmune serum negative control แทนที่แอนติบอดี (รูปที่ 7B, 7D, 7F และ 7H) ตารางที่ 2 แสดงระดับความเข้มของการติดสีย้อมบนชิ้นเนื้อจากไลเคนพลานัส 15 ตัวอย่าง โครนิคฮัยเปอร์พลาสติก แคนดิเดียซิส 5 ตัวอย่าง และไฟโบรมา 3 ตัวอย่าง

การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในตำแหน่งที่ใกล้กับสายราแคนดิดา

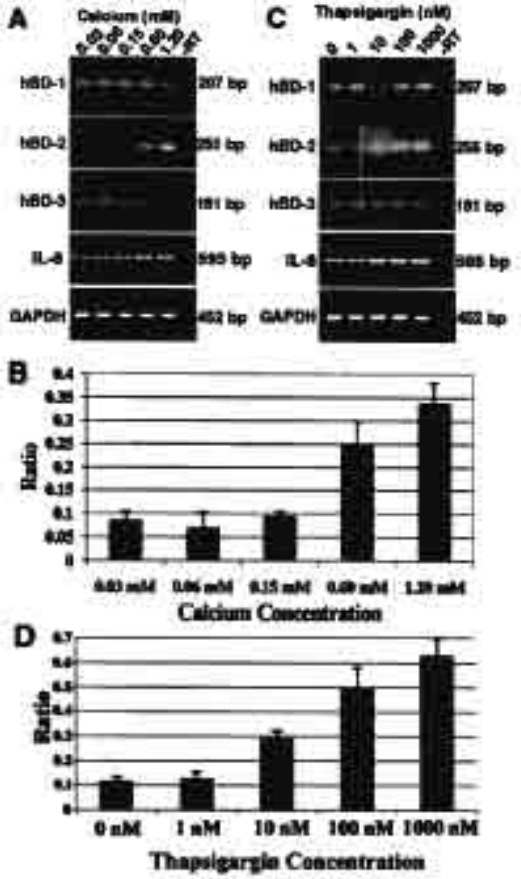
ในชิ้นเนื้อไลเคนพลานัสบางชิ้นพบสายราแคนดิดาซึ่งย้อมติดสีม่วงชมพูด้วยเทคนิค PAS (หัวลูกศรในรูปที่ 8C) อยู่บริเวณผิว ซึ่งใกล้กับตำแหน่งที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู (รูปที่ 8A และ 8B) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาด้วยเทคนิค imprint culture พบว่ามีการติดเชื้อราแคนดิดาตรงบริเวณรอยโรคไลเคนพลานัส ทั้ง 15 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค imprint culture มีความไวในการตรวจหาการติดเชื้อราบริเวณรอยโรคมากกว่าการย้อมด้วยเทคนิค PAS นอกจากนี้พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู (รูปที่ 8D และ 8E ตามลำดับ) ในบริเวณที่ใกล้กับตำแหน่งของสายราแคนดิดาในรอยโรคโครนิคฮัยเปอร์พลาสติก แคนดิเดียซิส (รูปที่ 8F)

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู และการปรากฏของเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ในเยื่อบุผิวและการทำลายของเบสเมนท์เมมเบรน

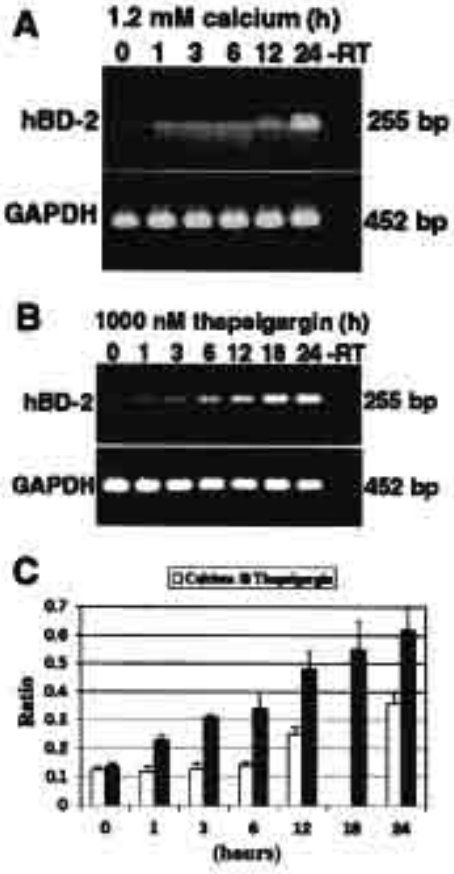
จากการย้อมหาตำแหน่งของเซลล์เม็ดเลือดขาวที-ลิมโฟซัยท์ในไลเคนพลานัสด้วยแอนติบอดีต่อ CD45RO ซึ่งใช้ตรวจหาเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ที่ถูกกระตุ้นและเกิดความจำขึ้น (activated and memory T-lymphocyte) พบว่าเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์อยู่รวมกันเป็นแถบ (lymphocytic band) ใต้ต่อชั้นเยื่อบุผิว และยังพบว่าเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ดังกล่าวอยู่กระจัดกระจายภายในชั้นเยื่อบุผิวอีกด้วย (intraepithelial T-lymphocyte) (หัวลูกศรในรูปที่ 9F) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการทำลายของเบสเมนท์เมมเบรนที่ตั้นระหว่างเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (รูปที่ 9E) ในขณะที่เบสเมนท์เมมเบรนที่อยู่ล้อมรอบเส้นเลือดในรอยโรค ยังคงปกติอยู่ (หัวลูกศรในรูปที่ 9E) การปรากฏของเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์และการทำลายของเบสเมนท์เมมเบรนในไลเคนพลานัสสนับสนุนสมมติฐานการเกิดพยาธิสภาพของไลเคนพลานัส โดยเกิดขบวนการตายของเซลล์เยื่อบุผิวแบบอะพอพโตซิสโดยเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ที่ผ่านเข้ามาในชั้นเยื่อบุผิว (Sugerman *et al.*, 2002) และยังแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ในชั้นเยื่อบุผิวของไลเคนพลานัส (รูปที่ 9C และ 9D ตามลำดับ) และการเกิดขบวนการตายของเซลล์เยื่อบุผิวแบบอะพอพโตซิส

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู และขบวนการอะพอพโตซิสในเซลล์เยื่อบุผิวของไลเคนพลานัส

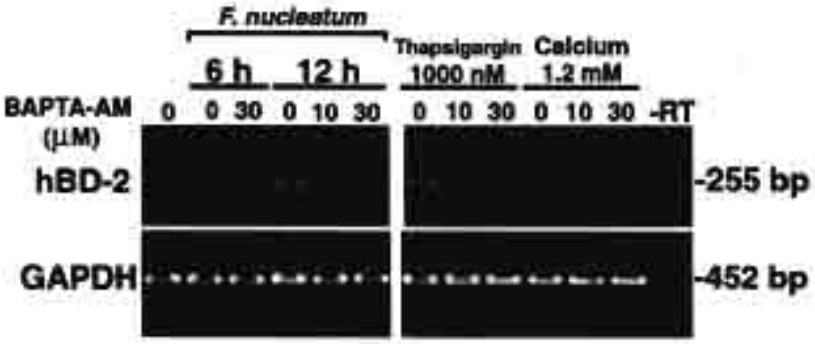
เพื่อตรวจหาความสัมพันธ์ดังกล่าว ได้ทำการย้อมหาตำแหน่งของเอ็นไซม์คาสเปส-ทรี ในรูปแบบที่ทำงานได้ (active form) และตำแหน่งของ โพลี(เอดีพี-ไรโบส)โพลีเมอเรส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นตัวหนึ่งของเอ็นไซมคาสเปส-ทรีนี้ในรูปแบบที่ถูกตัดแล้ว ในรอยโรคไลเคนพลานัส จากการศึกษาพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์คาสเปส-ทรีในรูปแบบที่ทำงานในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวของโรคไลเคนพลานัส (ลูกศรในรูปที่ 10C) และพบการแสดงออกของโพลี(เอดีพี-ไรโบส)โพลีเมอเรสในรูปแบบที่ถูกตัดในบริเวณเดียวกัน (หัวลูกศรในรูปที่ 10D) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู (รูปที่ 10A และ 10B ตามลำดับ) สัมพันธ์กับขบวนการอะพอพโตซิสที่เกิดขึ้นในเซลล์เยื่อบุผิวของไลเคนพลานัส ถึงแม้ว่าจะไม่พบการทำลายของสารพันธุกรรมซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ตัวหนึ่งของการเกิดอะพอพโตซิส ด้วยวิธี *in situ* TUNEL assay ในชั้นเยื่อบุผิวของทั้งไลเคนพลานัสและโครนิคอัยเปอร์พลาสติกแคนดิเดียซิส (รูปที่ 11C และ 11G ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อเดียวกันซึ่งถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ nuclease เพื่อจงใจทำให้เกิดการทำลายของสารพันธุกรรม (หัวลูกศรในรูปที่ 11D และ 11H ตามลำดับ) ซึ่งถูกใช้เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลบวกสำหรับเทคนิคนี้



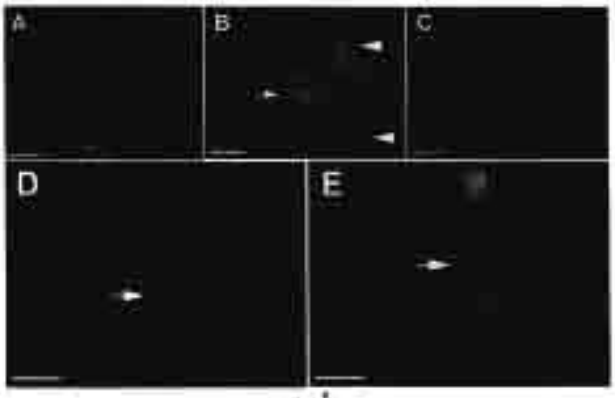
รูปที่ 3



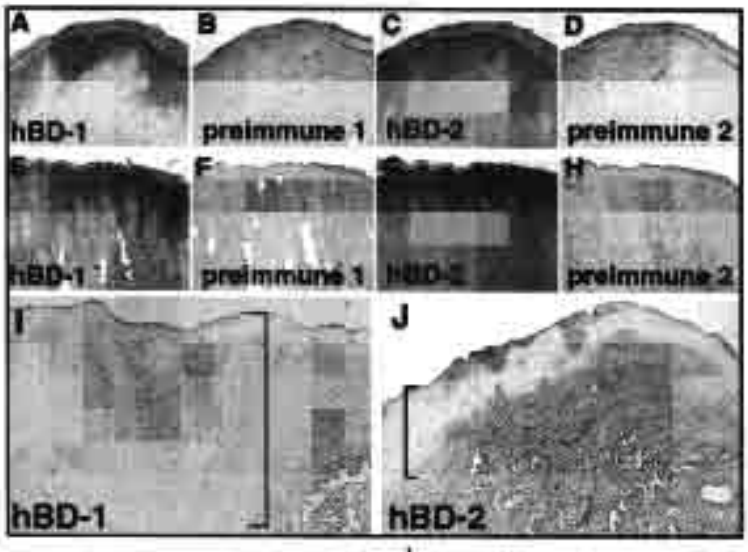
รูปที่ 4



รูปที่ 5



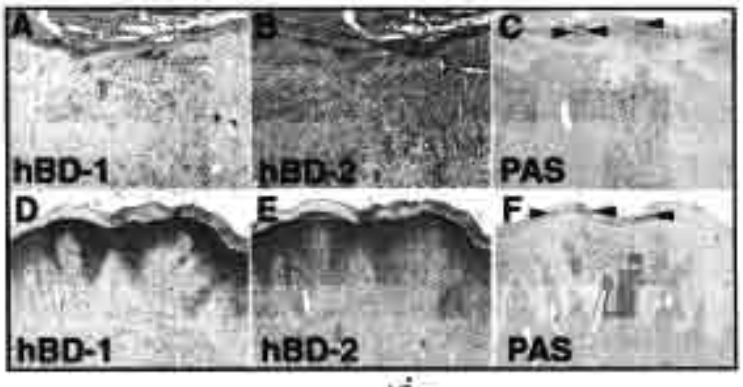
รูปที่ 6



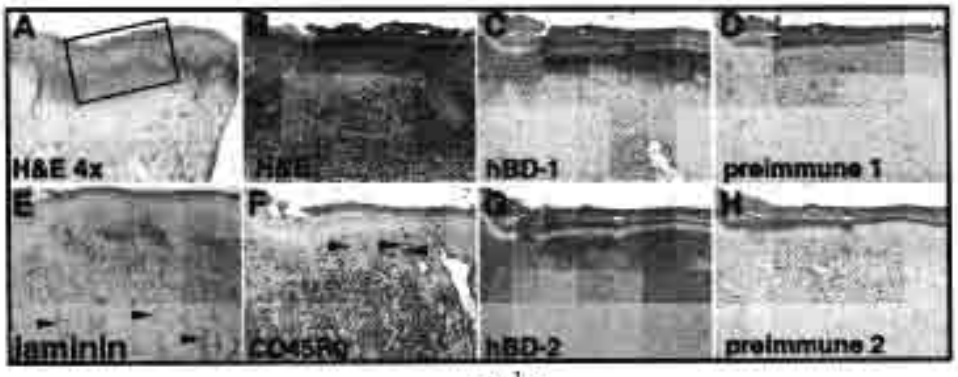
รูปที่ 7

	Levels of hBD-1 and -2 staining (number of specimens)			
	Intense	Moderate	Weak	None
OLP (n =15)	6	5	3	1
CHC (n = 5)	3	2	-	-
Normal buccal mucosa (n= 3)	-	-	-	3

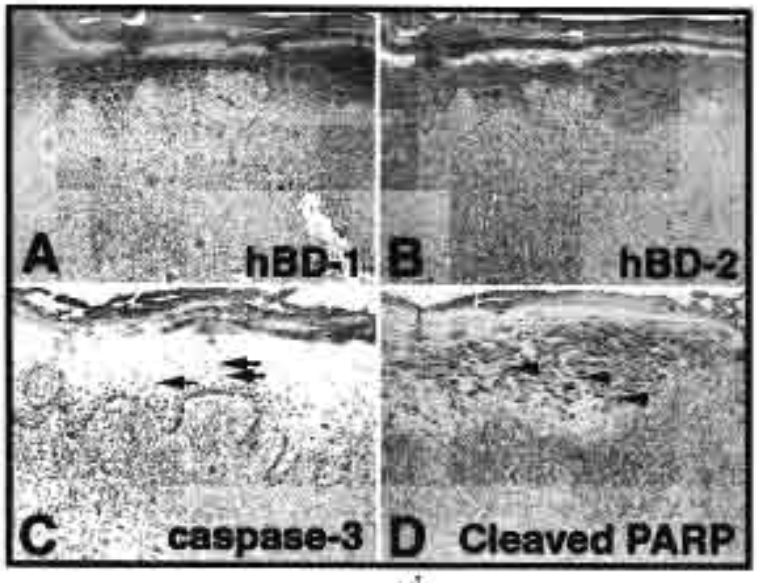
ตารางที่ 2



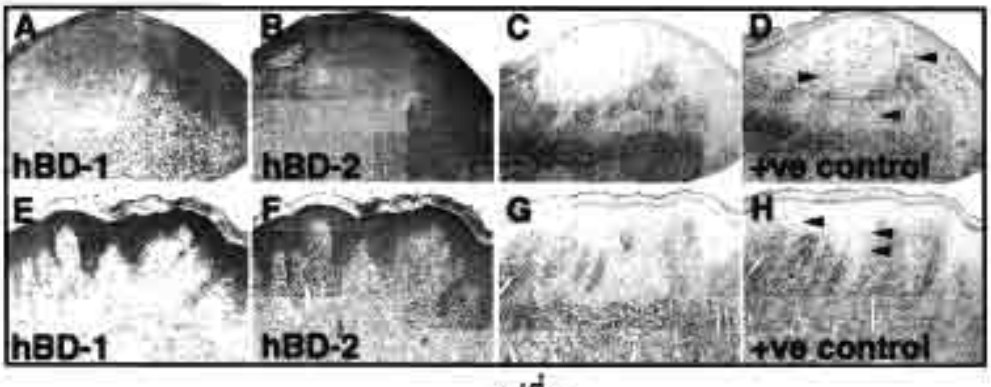
รูปที่ 8



รูปที่ 9


A
hBD-1
B
hBD-2
C
caspase-3
D
Cleaved PARP

รูปที่ 10


A
hBD-1
B
hBD-2
C
D
+ve control
E
hBD-1
F
hBD-2
G
H
+ve control

รูปที่ 11

บทวิจารณ์

บทบาทของแคลเซียมต่อการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ในหลอดทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาถึงเส้นทางสื่อสัญญาณซึ่งควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน จากการศึกษาที่ผ่านมาของหัวหน้าโครงการพบการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูสัมพันธ์กับการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เยื่อบุผิวช่องปาก (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000; Dale *et al.*, 2001) และการเหนี่ยวนำการสร้างเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดย *Fusobacterium nucleatum* ต้องอาศัยการกระตุ้นเส้นทางสื่อสัญญาณที่มีชื่อว่า mitogen activated protein kinase (Krisanaprakornkit *et al.*, 2002) ในการศึกษานี้พบว่าการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในเซลล์เยื่อบุผิวยังถูกควบคุมโดยระดับแคลเซียมที่สูงขึ้นทั้งภายนอกและภายในเซลล์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับตำแหน่งของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในชั้นซูปราเบเซิลและแกรนูล่าของชั้นเยื่อบุผิว (Dale *et al.*, 2001) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีการแสดงออกของดัวบ่งชี้สำหรับการเปลี่ยนสภาพขั้นสุดท้ายของเซลล์เยื่อบุผิว ซึ่งถูกควบคุมโดยความเข้มข้นของแคลเซียมที่เพิ่มขึ้น (Lee *et al.*, 1992) ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ 0.60 และ 1.20 mM ซึ่งใช้ในการกระตุ้นเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ทำให้เกิดการสร้างเยื่อบุผิวเป็นหลายๆ ชั้น (stratification) เกิดการสร้างคอร์นิฟายด์เอนเวลอพ และควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพขั้นสุดท้าย เช่น โปรฟิลแลกกริน ทรานสกลูตามิเนส และอินโวลูคริน (Eckert *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมภายในเซลล์มีความสำคัญต่อการกระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดยแบคทีเรีย เพราะว่า BAPTA-AM สามารถยับยั้งการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดย *Fusobacterium nucleatum* ดังนั้นเส้นทางสื่อสัญญาณโดยอาศัยแคลเซียมเป็นสื่อในเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากเกี่ยวข้องทั้งการควบคุมการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ และการพัฒนาสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่เยื่อบุผิวโดยการกระตุ้นการสร้างเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดยแคลเซียมในเซลล์เคอราติโนซัยท์ของผิวหนัง (Liu *et al.*, 2002) และนอกจากนี้ยังแสดงเพิ่มเติมอีกว่าการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูต้องอาศัยระดับของแคลเซียมที่สูงขึ้นภายในเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Frye และคณะ ปี 2001 ซึ่งพบว่าระดับแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่สูงขึ้นกระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันแต่ไม่ใช่เบต้า-ดีเฟนซิน-ทูใน keratinocyte cell line ความแตกต่างนี้อาจจะเนื่องมาจาก keratinocyte cell line ที่ใช้ศึกษาในการทดลองของ Frye และคณะกับการใช้ primary keratinocyte ในการศึกษานี้ นอกจากนี้ Frye และคณะยังศึกษาในเซลล์ที่ถูกเลี้ยงอย่างหนาแน่น (confluent) ประมาณ 7-14 วันหลังจากที่เซลล์เคอราติโนซัยท์เต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว ในขณะที่การศึกษานี้ทำการทดลองในเซลล์ที่ถูกเลี้ยงเกือบเต็มประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่ในจานเพาะเลี้ยง

ในทางตรงข้ามกับการกระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู การแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทรี ไม่ได้รับผลกระทบจากความเข้มข้นแคลเซียมที่เพิ่มขึ้น ถึงแม้ว่าทางคณะผู้วิจัยไม่ได้ตรวจสอบระดับการแสดงออกของเปปไทด์ จาก

การศึกษาที่ผ่านมาพบความสัมพันธ์ระหว่างเบต้า-ดีเฟนซิน-วันเปปไทด์และการเปลี่ยนสภาพในเนื้อเยื่อ ถึงแม้ว่าจะตรวจพบอาร์เอ็นเอ่มารหัสของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันในชั้นเยื่อบุผิวซึ่งมีจำนวนหลายชั้นมากกว่าเปปไทด์ของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน (Dale *et al.*, 2001) แต่ถึงอย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้จากหลอดทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในเนื้อเยื่ออย่างสิ้นเชิง เนื่องจากกลไกในการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เยื่อบุผิวในเนื้อเยื่อมีความสลับซ้อนมากกว่าที่ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนสภาพปัจจัยเดียวซึ่งก็คือแคลเซียมที่ใช้ในการทดลองนี้จะสามารถอธิบายได้ ดังนั้นการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อขบวนการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เยื่อบุผิวเช่น วิตามินดี (Bikle *et al.*, 2001) ต่อการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินจะช่วยทำให้เกิดความเข้าใจในกลไกการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินมากขึ้น

จากการศึกษาจลนศาสตร์ของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู พบการกระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูอย่างรวดเร็วโดย thapsigargin ซึ่งสามารถเปรียบเทียบได้กับการกระตุ้นโดย *Fusobacterium nucleatum* (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000) ซึ่งน่าจะเป็นเพราะว่า thapsigargin ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์อย่างทันทีแต่ชั่วคราวเท่านั้น (Jones and Sharpe, 1994) การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเมื่อถูกกระตุ้นด้วย thapsigargin เป็นระยะเวลานานก็น่าที่จะมาจากการที่แคลเซียมเคลื่อนเข้าสู่เซลล์จากภายนอกเซลล์ (Tombal *et al.*, 2002) ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Li *et al.*, 1995) และเช่นเดียวกันการกระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูอย่างรวดเร็วโดย *Fusobacterium nucleatum* ก็น่าจะมาจากการเพิ่มขึ้นอย่างทันทีแต่ชั่วคราวของระดับแคลเซียมภายในเซลล์ ในขณะที่การเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูอย่างต่อเนื่องจากการที่ถูกกระตุ้นด้วย *Fusobacterium nucleatum* เป็นระยะเวลานานก็น่าจะมาจากการที่แคลเซียมเคลื่อนเข้ามาในเซลล์ ความสำคัญของการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์ต่อการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเมื่อถูกกระตุ้นด้วย *Fusobacterium nucleatum* เห็นได้จากเมื่อใช้ BAPTA-AM ในการจับกับแคลเซียมภายในเซลล์สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูอย่างสิ้นเชิง (รูปที่ 5) สำหรับการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดยระดับที่สูงขึ้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่ช้ากว่านั้นจะมีลักษณะคล้ายกับการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดย phorbol ester (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000) ซึ่งน่าจะเป็นเพราะมีการเคลื่อนเข้าของแคลเซียมจากภายนอกเซลล์เข้าไปในเซลล์อย่างช้าๆ และต่อมาทำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพคล้ายกับการที่ phorbol ester ใช้เวลานานในการกระตุ้นให้เซลล์เคอราติโนซัยท์เปลี่ยนสภาพ (Yuspa *et al.*, 1983) โดยสรุปทางคณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าระดับแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่สูงขึ้นและ thapsigargin สามารถกระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ซึ่งผ่านทางการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์ และเช่นเดียวกัน *Fusobacterium nucleatum* กระตุ้นให้สร้างเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูมากขึ้นโดยผ่านทางเส้นทางสื่อสัญญาณที่ใช้แคลเซียม การศึกษากลไกที่ควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูน่าจะช่วยทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกในการป้องกันตัวเองของ

เซลล์ ขบวนการการเกิดโรค และความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เยื่อบุผิวและระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด เพิ่มมากขึ้น

การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในไลเคนพลานัสซึ่งสัมพันธ์กับอะพอพโตซิส

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในไลเคนพลานัสในช่องปาก เมื่อเปรียบเทียบชั้นเนื้อเยื่อบุผิวปกติที่คลุมไฟโบรมา แสดงให้เห็นว่าเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิดเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นอย่างเรื้อรังภายในรอยโรค นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้นี้ก็สอดคล้องกับผลการทดลองของ Abiko และคณะ ปี 2002 ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในไลเคนพลานัส แต่ยังพบว่านอกจากเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูที่เพิ่มขึ้นในไลเคนพลานัสในช่องปากแล้ว เบต้า-ดีเฟนซิน-วันก็ยังเพิ่มขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในบริเวณใกล้เคียงกับสายราแคนดิดา ก็ยืนยันถึงหน้าที่ในการปกป้องการติดเชื้อของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิดที่เยื่อบุผิว นอกจากพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในไลเคนพลานัสแล้ว ยังพบอีกว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิดในโรคโครนิค อัยเปอร์พลาสติก แคนดิเดียซิส ซึ่งก็อยู่ใกล้กับบริเวณที่พบสายราแคนดิดาอีกด้วย

ลักษณะที่พบเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ชนิดที่ถูกกระตุ้นและมีหน่วยความจำและการพบการทำลายของเบสเมนท์เมมเบรนในไลเคนพลานัสสอดคล้องกับผลการทดลองโดย Zhou และคณะปี 2002 และยังสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่าเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ที่เข้าไปในชั้นเยื่อบุผิวจากการที่เบสเมนท์เมมเบรนถูกทำลาย ทำให้เกิดการทำลายเซลล์เยื่อบุผิวแบบอะพอพโตซิส (Sugerman *et al.*, 2002) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่การเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิดในรอยโรคไลเคนพลานัสจะสัมพันธ์กับขบวนการเกิดอะพอพโตซิสในชั้นเยื่อบุผิว

ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจสอบหาการแสดงออกของตัวบ่งชี้ของการเกิดอะพอพโตซิสในไลเคนพลานัส โดยเน้นตัวบ่งชี้สองชนิดคือ 1. ตรวจหาการแสดงออกของเอ็นไซม์คาสเปส-ทรีในรูปแบบที่ทำงานได้และการแสดงออกของสารตั้งต้นที่ถูกตัดของเอ็นไซม์คาสเปส-ทรี ซึ่งก็คือ โพลี(เอดีพี-ไรโบส)โพลีเมอเรสในรูปแบบที่ถูกตัด เพื่อตรวจหาการแสดงออกของเอ็นไซม์และตรวจสอบว่าเอ็นไซม์ที่แสดงออกนั้นทำหน้าที่ได้จริงๆ 2. ตรวจหาการแตกออกเป็นท่อนๆ ของสารพันธุกรรมในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวในไลเคนพลานัส ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ตัวหนึ่งของอะพอพโตซิส ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้พบการแสดงออกของเอ็นไซม์คาสเปส-ทรีในรูปแบบที่ทำงานได้และยังพบการแสดงออกของโพลี(เอดีพี-ไรโบส)โพลีเมอเรสในรูปแบบที่ถูกตัดในชั้นเยื่อบุผิวของไลเคนพลานัสตรงบริเวณที่มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับชั้นเยื่อบุผิวปกติที่คลุมเนื้องอกไฟโบรมา ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิดจะถูกควบคุมโดยโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโตซิส ดังนั้นสมมติฐานนี้จึงน่าจะได้ทำการทดสอบในหลอดทดลองต่อไปในการศึกษาหน้า การติดสีในซัย

โดพลาซึม (cytoplasmic staining) ของโพลี(เอดีพี-ไรโบส)โพลีเมอเรสซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่อยู่ในนิวเคลียสสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาใน Hep-2 cell line ซึ่งพบว่าหลังจากที่โพลี(เอดีพี-ไรโบส)โพลีเมอเรสถูกตัดแล้ว ก็จะยื่นออกมานอกนิวเคลียสเข้าไปอยู่ในซัยโดพลาซึมและพบในเซลล์ที่เกิดอะพอพโตซิสในขั้นสุดท้ายและนอกจากนี้เซลล์พวกนี้ยังไม่เกิดการแตกของสารพันธุกรรม (Soldani *et al.*, 2001)

เป็นที่น่าประหลาดใจว่าไม่พบการแตกออกเป็นท่อนของสารพันธุกรรมในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวในไลเคนพลานัส ทั้งๆ ที่มีการแสดงออกของตัวบ่งชี้ตัวอื่นๆ ของขบวนการอะพอพโตซิสดังที่ได้กล่าวข้างต้น ผลการทดลองนี้ขัดกับผลจากการศึกษาที่ผ่านมาที่แสดงถึงการแตกออกเป็นท่อนของสารพันธุกรรมในไลเคนพลานัส (Bloor *et al.*, 1999; Neppelberg *et al.*, 2001) แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็มีรายงานการศึกษาที่ผ่านมาในเซลล์ชนิดอื่นที่ไม่พบการแตกออกเป็นท่อนของสารพันธุกรรมเกิดขึ้นในขบวนการอะพอพโตซิส (Tomei *et al.*, 1993) หรือแม้กระทั่งในเซลล์เคอราติโนซัยท์จากผิวหนังมนุษย์ (Jansen *et al.*, 2003) และนอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาในเซลล์ชนิดอื่นๆ ที่พบว่าการแตกออกเป็นท่อนของสารพันธุกรรมมักจะไม่พบในเซลล์ที่เอ็นไซม์คาสเปส-ทรีถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ (activated form) (Badran *et al.*, 2003; Brecht *et al.*, 2001) จึงเป็นไปได้ว่าการแตกออกของสารพันธุกรรมในนิวเคลียสอาจจะไม่ใช่ตัวบ่งชี้ที่สำคัญของขบวนการอะพอพโตซิสในไลเคนพลานัสในช่องปาก หรือการกระตุ้นการทำงานของคาสเปส-ทรีซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของอะพอพโตซิสโดยปราศจากการทำลายของสารพันธุกรรม (DNA fragmentation) เป็นขบวนการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง (dynamic degenerative process) ซึ่งยังไม่ถึงขั้นสุดท้ายที่เซลล์ถูกทำลายและตายโดยไม่หวนกลับคืน

เมื่อเร็วๆ นี้พบว่าการเกิด single nucleotide polymorphisms (SNPs) ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟ่าและอินเตอร์เฟียรอนแกมม่าทำให้เพิ่มโอกาสเสี่ยงมากขึ้นในการเกิดโรคไลเคนพลานัสในช่องปาก (Carrozzo *et al.*, 2004) จากผลการทดลองนี้จึงเป็นไปได้ที่ว่าการเกิด single nucleotide polymorphisms ในยีนเบต้า-ดีเฟนซินทั้ง 4 ชนิดได้แก่เบต้า-ดีเฟนซิน-วัน เบต้า-ดีเฟนซิน-ทู เบต้า-ดีเฟนซิน-ทรี และเบต้า-ดีเฟนซิน-โฟร์ อาจจะทำให้บุคคลนั้นมีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นไลเคนพลานัสเช่นเดียวกัน ที่เป็นเช่นนี้เพราะ ทางคณะผู้วิจัยคาดเดาจากผลการทดลองที่พบว่าเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเพิ่มขึ้นในไลเคนพลานัส เช่นเดียวกับที่พบซัยโตคายน์ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นในไลเคน พลานัส (Fayyazi *et al.*, 1999) นอกจากนั้นแบต้า-ดีเฟนซินยังสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเคลื่อนที่และการกระตุ้นของแมสท์เซลล์ (Niyonsaba *et al.*, 2002) เซลล์เดนดริติกและที-ลิมโฟซัยท์ (Yang *et al.*, 1999) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าทั้งแมสท์เซลล์และเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของไลเคนพลานัสโดยที่เซลล์ทั้งสองชนิดสามารถสร้างและหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟ่าและอินเตอร์เฟียรอนแกมม่า (Walsh *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2001) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาว่าจริงๆ แล้วบุคคลที่เสี่ยงต่อการเป็นไลเคนพลานัสในช่องปาก มี SNPs เกิดขึ้นในยีนของเบต้า-ดีเฟนซินทั้ง 4 ชนิดหรือไม่เมื่อเทียบกับ SNPs ที่เกิดขึ้นในซัยโตคายน์ทั้งสองชนิดดังกล่าวข้างต้น

References

Abiko Y, Jinbu Y, Noguchi T, Nishimura M, Kusano K, Amaratunga P, Shibata T, Kaku T (2002). Upregulation of human beta-defensin-2 peptide expression in oral lichen planus, leukoplakia and candidiasis. An immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* **198**: 537-542.

Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG (2001). Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* **117**: 106-111.

Arendorf TM, Walker DM (1980). The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol* **25**:1-7.

Badran A, Iwasaki H, Inoue H, Ueda T (2003). Atypical nuclear apoptosis downstream to caspase-3 activation in ara-C treated CCRF-CEM cells. *Int J Oncol* **22**: 517-522.

Bals R, Goldman MJ, Wilson JM (1998a). Mouse β-defensin-1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect Immun* **66**: 1225-1232.

Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff MA, Wilson JM (1998b). Human β–defensin-2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* **102**: 874-880.

Barnard NA, Scully C, Eveson JW, Cunningham S, Porter SR (1993). Oral cancer development in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **22**: 421-424.

Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz KP, Frossmann WJ (1995). HBD-1: A novel beta defensin from human plasma. *FEBS Lett* **368**: 331-335.

Bikle DD, Ng D, Tu CL, Oda Y, Me Z (2001). Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol* **177**: 161-171.

Bloor BK, Malik FK, Odell EW, Morgan PR (1999). Quantitative assessment of apoptosis in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **88**: 187-195.

Brecht S, Gelderblom M, Srinivasan A, Mielke K, Dityateva G, Herdegen T (2001). Caspase-3 activation and DNA fragmentation in primary hippocampal neurons following glutamate excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res* **94**: 25-34.

Carrozzo M, Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Arduino P, Broccoletti R, Vezza D, Rendine S, Curtoni ES, Gandolfo S (2004). Tumor necrosis factor-α and interferon-γ polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *J Invest Dermatol* **122**: 87-94.

Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts FA, Robinovitch M, O'Neal R, Valore EV, Ganz T, Anderson MG, Weinberg A (2001). Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodont Res* **36**: 285-294.

Diamond DL, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Ganz T, Dale BA (2001). Detection of β–defensins secreted by human oral epithelial cells. *J Immunol Methods* **256**: 65-76.

Diamond G, Bevins CL (1998). β–defensins: Endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin Immunol Immunopathol* **88**: 221-225.

Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL (1991). Tracheal antimicrobial peptide, a novel cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: Peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3952-3956.

Eckert RL, Crish JF, Banks EB, Welter JF (1997). The epidermis: genes on-genes off. *J Invest Dermatol* **109**: 501-509.

Fayyazi A, Schweyer S, Soruri A, *et al.* (1999). T lymphocyte and altered keratinocyte express interferon-gamma and interleukin 6 in lichen planus. *Arch Dermatol Res* **291**: 485-490.

Frye M, Bargon J, Gropp R (2001). Expression of human beta-defensin-1 promotes differentiation of keratinocytes. *J Mol Med* **79**: 275-282.

Fulton C, Anderson MG, Zasloff MA, Bull R, Quinn AG (1997). Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet* **350**: 1750-1751.

Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG (2001). Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* **15**: 1819-1821.

Goldman MJ, Anderson MG, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM (1997). Human beta defensin 1 is a salt sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**: 553-560.

Hancock REW (1997). Peptide antibiotics. *Lancet* **349**: 418-422.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (1997). A peptide antibiotic from human skin [letter]. *Nature* **387**: 861.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2000). Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* **276**: 5707-5713.

Hatchuel DA, Peters E, Lemmer J, Hille JJ, McGraw WT (1990). Candidal infection in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **70**: 172-175.

Jansen BJ, van Ruissen F, Cerneus S, Cloin W, Bergers M, van Erp PE, Schalkwijk J (2003). Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand triggers apoptosis in dividing but not in differentiated human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **121**: 1433-1439.

Jones KT, Sharpe GR (1994). Thapsigargin raises intracellular free calcium levels in human keratinocytes and inhibits the coordinated expression of differentiation markers. *Exp Cell Res* **210**: 71-76.

Kagan BL, Ganz T, Lehrer RI (1994). Defensins: A family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* **87**: 131-149.

Kagnoff MR, Eckmann L (1997). Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* **100**: S51-S55.

Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA (2000). Inducible expression of human β-defensin-2 (hBD-2) by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: Multiple signaling pathways and the role of commensal bacterial in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* **68**: 2907-2915.

Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA (2002). Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family. *J Immunol* **168**: 316-324.

Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA (1998). Expression of the peptide antibiotic human beta defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* **66**: 4222-4228.

Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Mao-Quiang M, Feingold KR (1992). Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J Clin Invest* **89**: 530-538.

Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T (1993). Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* **11**: 105-128.

LI L, Tucker RW, Hennings H, Yuspa SH (1995). Inhibitors of the intracellular Ca^{2+}-ATPase in cultured mouse keratinocytes reveal components of terminal differentiation that are regulated by distinct intracellular Ca^{2+} compartments. *Cell Growth Differ* **6**: 1171-1184.

Liu AY, Destoumieux D, WongAV, Park CH, Valore EV, Liu L, Ganz T (2002). Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol* **118**: 275-281.

McManus JFA (1948). *Stain Techn.* 23:99-108, (AFIP modification). Copyright by Williams and Wilkins Co.

Menon GK, Elias PM (1991). Ultrastructural localization of calcium in psoriatic and normal human epidermis. *Arch Dermatol* **127**: 57-63.

Missero C, Di Cunto F, Kiyokawa H, Koff A, Dotto GP (1996). The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor 5 progression. *Genes Dev* **10**: 3065-3075.

Neppelberg E, Johannessen AC, Jonsson R (2001). Apoptosis in oral lichen planus. *Eur J Oral Sci* **109**: 361-364.

Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I (2001). Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensin-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol* **31**: 1066-1075.

Niyonsaba F, Iwabuchi K, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I (2002). Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int Immunol* **14**: 421-426.

Patterson-Delafield J, Martinez RJ, Lehrer RI (1980). Microbial cationic proteins in rabbit alveolar macrophages: A potential host defense mechanism. *Infect Immun* **30**: 180-192.

Polakowska RR, Goldsmith LA (1991). The cell envelope and transglutaminase. In: Biochemistry, physiology and molecular biology of the skin. Goldsmith LA, editor. Oxford: Oxford University Press, pp. 168-201.

Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA (1995). Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* **267**: 1645-1648.

Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, Holmstrup P, Mutlu S, Porter SR, Wray D (1998). Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med* **9**: 86-122.

Selsted ME, Brown DM, Delange RJ, Lehrer RI (1983). Primary structure of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J Biol Chem* **258**: 14485-14489.

Selsted ME, Tang YQ, Morris WL, McGuire PA, Novotny MJ, Smith W, Henschen AH, Cullor JS (1993). Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta

defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem* **268**: 6641-6648.

Sklavounou AD, Laskaris G (1983). Frequency of desquamative gingivitis in skin diseases. *Oral Surg* **56**: 141-144.

Soldani C, Bottone MG, Pellicciari C, Scovassi AI (2001). Two-color fluorescence detection of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) cleavage and DNA strand breaks in etoposide-induced apoptotic cells. *Eur J Histochem* **45**: 389-392.

Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, Seymour GJ, Bigby M (2002). The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**: 351-367.

Thorn JJ, Holmstrup P, Rindrum J, Pindborg JJ (1988). Course of various clinical forms of oral lichen planus. A prospective follow-up study of 611 patients. *J Oral Pathol* **17**: 213-218.

Tombal B, Denmeade SR, Gillis JM, Isaacs JT (2002). A supramicromolar elevation of intracellular free calcium $[Ca^{2+}]_i$ is consistently required to induce the execution phase of apoptosis. *Cell Death Differ* **9**: 561-573.

Tomei LD, Shapiro JP, Cope FO (1993). Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-stranded cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 853-857.

Tomita T, Nagase T, Ohga E, Yamaguchi Y, Yoshizumi M, Ouchi Y (2002). Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad). *Respirology* **7**: 305-310.

Valore EV, Park CH, Quayle A, Wiles KR, McCray PBJr, Ganz, T (1998). Human β-defensin-1, an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* **101**: 1633-1642.

Walsh LJ, Davis MF, Xu LJ, Savage NW (1995). Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *J Oral Pathol Med* **24**: 266-272.

Walsh LJ, Savage NW, Ishii T, Seymour GJ (1990). Immunopathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **19**: 389-396.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schroder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**: 420-421.

Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ (2001). Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukoc Biol* **69**: 691-697.

Yu Y, De Waele C, Chadee K (2001). Calcium-dependent interleukin-8 gene expression in T84 human colonic epithelial cells. *Inflamm Res* **50**: 220-226.

Yuspa SH, Ben T, Hennings H (1983). The induction of epidermal transglutaminase and terminal differentiation by tumor promoters in cultured epidermal cells. *Carcinogenesis* **4**: 1413-1418.

Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR (1989). Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations *in vitro*. *J Cell Biol* **109**: 1207-1217.

Zhao C, Wang I, Lehrer RI (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* **396**: 319-322.

Zhao ZZ, Sugerman PB, Zhou XJ, Walsh LJ, Savage NW (2001). Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus. *Oral Dis* **7**: 246-251.

Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Symour GJ (2002). Intra-epithelial CD8+ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* **31**: 23-27.

Outputs จากโครงการวิจัยที่ได้ทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

   - Krisanaprakornkit S, Jotikasthira D, Dale BA (2003). Intracellular calcium in signaling human beta-defensin-2 expression in oral epithelial cells. *J Dent Res* 82:877-882.

   - Krisanaprakornkit S, Pongsiriwet S, Dale BA. Up-regulation of human β-defensin-1 and –2 in oral lichen planus in association with apoptosis. *J Invest Dermatol* (submitted).

   (โปรดดูเอกสารต่างๆ ในภาคผนวก)

2. การนำเสนอผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

   เชิงสาธารณะ 1. เกิดเครือข่ายความร่วมมือกับอาจารย์ที่ปรึกษาเก่าคือ Prof. Beverly A. Dale-Crunk จาก School of Dentistry, University of Washington, Seattle, WA, USA

   2. สร้างกระแสความสนใจในวงกว้างในต่างประเทศ ดังเห็นได้จาก ได้รับเชิญให้เขียนบทความลงตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ Journal of Oral Biosciences & Medicine และมีนักวิชาการผู้สนใจชาวต่างประเทศเขียนจดหมายมาขอ reprint ของผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสาร *J Dent Res* (โปรดดูเอกสารต่างๆ ในภาคผนวก)

   เชิงวิชาการ 1. นำความรู้ใหม่ที่ได้ไปใช้ในการเรียนการสอนในระดับหลังปริญญา

   2. เกิดโครงการวิจัยใหม่ๆ ต่อเนื่องหลายโครงการ เพื่อสมัครขอรับทุนพัฒนานักวิจัย (เมธีวิจัย สกว.) ประจำปี พ.ศ. 2547

   3. เป็นประโยชน์ต่อการเขียนตำราเพื่อเผยแพร่เรื่อง "ชีววิทยาของเนื้อเยื่อช่องปาก"

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

   บทวิทยาการ

   Krisanaprakornkit S, Khongkhunthian S, Chotipanich T, Umpriwan R (2003). The pilot study of association between the quantities of five periodontopathic pathogens and the levels of periodontal pocket depth. *J Dent Assoc Thai* (in press). (โปรดดูเอกสารในภาคผนวก)

   บทความปริทัศน์

   - สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ. ไมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน. ว ทันต. 2546; 52: 429-38.

   - สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ. เทคนิคทางอณูชีววิทยาสำหรับงานวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์. ว ทันต. 2546; 53: 131-140.

- สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ. พยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลของไลเคนพลานัส. เชียงใหม่ทันตแพทยสาร (กำลังรอตีพิมพ์) (โปรดดูเอกสารต่างๆ ในภาคผนวก)

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

- เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายที่งานประชุม International Association of Oral Pathologists ณ ประเทศสิงคโปร์ระหว่างวันที่ 5-8 สิงหาคม พ.ศ. 2545

  เรื่อง "The Effect of Exogenously Added Calcium on the Expression of Human β-Defensins in Human Gingival Epithelial Cells" (โปรดดูเอกสารในภาคผนวก)
- เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานทางวิชาการแบบโปสเตอร์ที่งานประชุม International Association of Dental Research เมืองฮอนโนลูลู มลรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างวันที่ 10-13 มีนาคม พ.ศ. 2547 เรื่อง "Up-regulation of Human Beta-Defensins in Lichen Planus and Hyperplastic Candidiasis" (โปรดดูเอกสารในภาคผนวก)

ภาคผนวก

ประกอบด้วย

1. Reprint ของบทวิทยาการ Krisanaprakornkit S, Jotikasthira D, Dale BA (2003). Intracellular calcium in signaling human beta-defensin-2 expression in oral epithelial cells. *J Dent Res* 82:877-882.

2. Reprint ของบทวิทยาการ The pilot study of association between the quantities of five periodontopathic pathogens and the levels of periodontal pocket depth *J Dent Assoc Thai* (in press)

3. Reprint ของบทความปริทัศน์ สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ. โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน. ว ทันต. 2546; 52: 429-38.

4. Reprint ของบทความปริทัศน์ สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ. เทคนิคทางอณูชีววิทยาสำหรับงานวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์. ว ทันต. 2546; 53: 131-140.

5. Reprint ของบทความปริทัศน์ สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ. พยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลของไลเคนพลานัส. เชียงใหม่ทันตแพทยสาร (กำลังรอตีพิมพ์)

6. จดหมายเชิญให้เขียนบทความลงตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Oral Biosciences & Medicine

7. จดหมายขอ reprint จาก The Czech Republic

8. จดหมายขอ reprint จาก Portugal

9. บทคัดย่อเรื่อง "The Effect of Exogenously Added Calcium on the Expression of Human β-Defensins in Human Gingival Epithelial Cells"

10. บทคัดย่อเรื่อง "Up-regulation of Human Beta-Defensins in Lichen Planus and Hyperplastic Candidiasis"

JDR JOURNAL OF DENTAL RESEARCH®

Volume 82 • Number 11 • November 2003

Intracellular Calcium in Signaling Human β-Defensin-2 Expression in Oral Epithelial Cells

S. Krisanaprakornkit, D. Jotikasthira, and B.A. Dale

S. Krisanaprakornkit[1]*, D. Jotikasthira[2], and B.A. Dale[3]

[1]Department of Odontology-Oral Pathology, [2]Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand; and [3]Department of Oral Biology, School of Dentistry, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA; *corresponding author, sutichai@chiangmai.ac.th, suttichaikris@yahoo.com

J Dent Res 82(11):877-882, 2003

Intracellular Calcium in Signaling Human β-Defensin-2 Expression in Oral Epithelial Cells

ABSTRACT

Expression of human β-defensins is correlated with differentiation in the oral epithelium, consistent with their function as part of the epithelial antimicrobial barrier. Because calcium is a known regulator of epithelial differentiation, we tested the hypothesis that calcium concentration mediates β-defensin expression. Gingival epithelial cells were cultured in medium containing low calcium concentration (0.03 mM), then either changed to high extracellular calcium concentrations or stimulated with thapsigargin to release intracellular calcium stores in the presence or absence of BAPTA-AM, a calcium chelator. Human β-defensin-2 (hBD-2) mRNA expression was rapidly induced by thapsigargin, and more slowly induced by high extracellular calcium. Induction of hBD-2 peptide was confirmed by immunofluorescence. BAPTA-AM inhibited hBD-2 induction by both thapsigargin and calcium in a dose-dependent fashion. In addition, BAPTA-AM inhibited hBD-2 induction by a bacterial stimulant. Collectively, these findings demonstrate that intracellular calcium is a critical mediator of hBD-2 expression. Abbreviations used in this study are: BAPTA-AM, 1,2-bis(2-amino-phenoxy)-ethane-N,N,N′,N′-tetra-acetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester); DMSO, dimethylsulfoxide; *F. nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum*; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HBDs, human β-defensins; HGECs, human gingival epithelial cells; MAP, mitogen-activated protein; and RT-PCR, reverse-transcriptase/polymerase chain-reaction.

KEY WORDS: innate immunity, antimicrobial peptide, β-defensins, calcium, thapsigargin.

Received December 18, 2002; Last revision June 3, 2003; Accepted July 25, 2003

INTRODUCTION

Oral stratified epithelia function as a mechanical barrier, but in addition, they function as an active antimicrobial barrier *via* the production of antimicrobial peptides, such as those of the β-defensin family (reviewed in Dale, 2002). The β-defensins are a component of the innate immune system and also bridge innate and acquired immune responses by acting as chemoattractants for mast cells (Niyonsaba *et al.*, 2002), immature dendritic cells, and T-lymphocytes (Yang *et al.*, 1999). Several β-defensins are found in oral epithelia. Human β-defensin-1 is widely distributed in epithelia (Zhao *et al.*, 1996), including oral epithelial cells and tissue. HBD-2, originally identified in psoriatic skin (Harder *et al.*, 1997), is also expressed in oral epithelia (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000). Expression of hBD-1 in oral epithelial cells is constitutive (Krisanaprakornkit *et al.*, 1998; Mathews *et al.*, 1999), while hBD-2 is up-regulated in response to bacterial stimulants, phorbol ester, TNF-α (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000), and IL-1 (Mathews *et al.*, 1999). HBD-1 and -2 demonstrate a broad spectrum of antimicrobial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria *in vitro* (Valore *et al.*, 1998). Another β-defensin, hBD-3, more specific for Gram-positive organisms, is induced by TNF-α and bacteria in cultured keratinocytes and airway epithelial cells and is also found in oral tissues (Harder *et al.*, 2001; Dunsche *et al.*, 2002).

Several studies suggest the association between hBD-1 and -2 expression and differentiation (Dale *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002). *In situ* hybridization revealed the localization of hBD-1 and hBD-2 mRNA within the suprabasal keratinocytes (Fulton *et al.*, 1997; Dale *et al.*, 2001). In cultured skin keratinocytes, hBD-2 induction is seen in large differentiating cells (Liu *et al.*, 2002). Tissue immunolocalization shows hBD-1 and hBD-2 peptides within the upper portion of the epithelium, consistent with their role in the antimicrobial barrier (Ali *et al.*, 2001; Dale *et al.*, 2001). Calcium is an important regulator of epithelial differentiation. Keratinocytes grown in low calcium concentration are proliferative, but when shifted to media containing higher calcium concentrations, they stratify and express differentiation markers such as involucrin, K1, K10, loricrin, and profilaggrin (Yuspa *et al.*, 1989). Calcium also stimulates the activity of transglutaminases, necessary for the production of cornified envelopes (Polakowska and Goldsmith, 1991; Missero *et al.*, 1996). The role of calcium in differentiation *in vivo* is reflected in the presence of a calcium gradient in epidermis that increases from the basal to the granular cell layer (Menon and Elias, 1991). Because expression of hBD-1 and -2 is associated with or regulated by the state of differentiation in oral epithelia and epidermis (Dale *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002), we postulated that calcium is an important component of molecular signaling for the expression of human β-defensins.

In this study, we show that hBD-2 mRNA and peptide regulation is mediated by extracellular and intracellular calcium. We find that the kinetics of hBD-2 mRNA induction by high extracellular calcium is slower than that in cells stimulated with thapsigargin, which increases intracellular calcium.

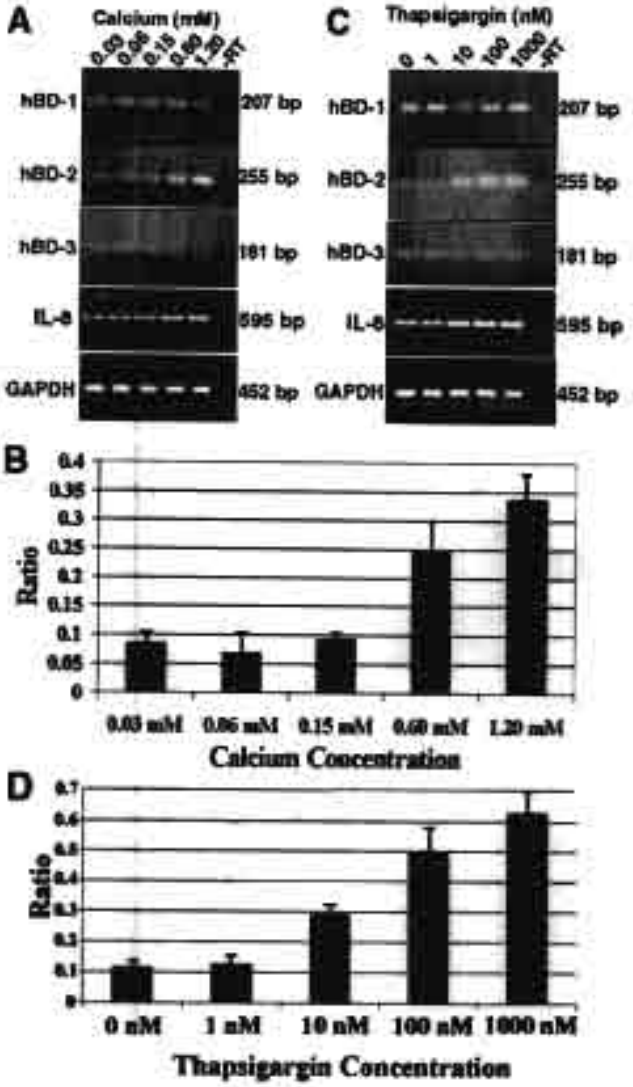


Figure 1. The effect of increased extracellular and intracellular calcium on β-defensin mRNA expression. **(A)** RT-PCR analysis. HGECs were incubated in various calcium concentrations (0.03, 0.06, 0.15, 0.60, or 1.20 mM) overnight. Total RNA was isolated and RT-PCR was conducted as described in MATERIALS & METHODS. The sizes of the amplified products for hBD-1, -2, -3, IL-8, and GAPDH are indicated and were as predicted. Note that hBD-2 and IL-8 mRNA were induced by increased extracellular calcium concentration in a dose-dependent manner, while hBD-1 and hBD-3 mRNA expression was not affected. A -RT sample was a negative control where enzyme was omitted. The data shown are representative of 5 separate experiments. **(B)** Densitometric analysis of hBD-2 expression as a function of calcium concentration. The relative ratios of hBD-2 to GAPDH were determined as described in MATERIALS & METHODS. The *y* axis represents the relative hBD-2 mRNA expression for the different calcium concentrations as shown in panel A. The results are represented as means plus standard deviations of 5 separate experiments. **(C)** RT-PCR analysis. HGECs were stimulated with various thapsigargin concentrations (0, 1, 10, 100, or 1000 nM) overnight. Note that hBD-2 and IL-8 mRNA were induced by thapsigargin in a dose-dependent fashion, whereas hBD-1 and hBD-3 mRNA expression was not affected. The data shown are representative of 4 separate experiments. **(D)** Densitometric analysis of hBD-2 expression as a function of thapsigargin concentration as shown in panel C. The results are represented as means plus standard deviations of 4 separate experiments.

Moreover, we demonstrate the calcium-dependent hBD-2 up-regulation by cell wall extract of *F. nucleatum*, an oral commensal bacterium. This work has implications for the molecular mechanisms involved in the expression of antimicrobial peptides in relation to epithelial differentiation.

MATERIALS & METHODS

Cell Culture

HGECs were isolated from gingival tissue overlying impacted third molars as described previously and collected in accordance with approved Human Subject policies (Krisanaprakornkit *et al.*, 1998). HGECs were cultured in serum-free keratinocyte growth medium (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD, USA), containing low calcium (0.03 mM). After 80% confluence, HGECs were stimulated with either 10 μg of *F. nucleatum* cell wall extract/mL, calcium (0.03, 0.06, 0.15, 0.60, and 1.20 mM), or thapsigargin (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 1, 3, 6, 12, 18, or 24 hrs in the presence or absence of BAPTA-AM (Sigma). Thapsigargin and BAPTA-AM were dissolved in DMSO and added to the culture medium so that the concentration was less than 0.1% of the total volume. The final concentrations of thapsigargin were 1, 10, 100, and 1000 nM; those of BAPTA-AM were 10 and 30 μM. The cell wall extract of *F. nucleatum* was prepared as described previously (Krisanaprakornkit *et al.*, 1998).

Isolation of Total RNA and RT-PCR

Total RNA was isolated by TRIZOL® LS reagent (Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples of total RNA were quantified by optical density reading at 260 nm. The β-defensin mRNAs were detected by means of RT-PCR. Briefly, a 3-μg quantity of each total RNA sample was used for the synthesis of cDNA by the SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies, Inc.). The RT-PCR protocol was previously described (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000), and PCR was performed in a Mastercycler Gradient thermal cycler (Eppendorf, Germany) for 28 cycles, according to the following steps: (1) 30 sec at 95°C; (2) 30 sec at 60 or 65°C; and (3) 1 min at 72°C. PCR primers for amplification of hBD-1, hBD-2, IL-8, and GAPDH were as previously used (Krisanaprakornkit *et al.*, 1998, 2000; Dale *et al.*, 2001). The primers for hBD-3 were 5'-TGA AGC CTA GCA GCT ATG AGG-3' (forward) and 5'-AGC ACT TGC CGA TCT GTT CCT-3' (reverse). The PCR products were resolved on a 1.5% agarose gel in 1X TBE and visualized with ethidium bromide staining. Photographs of gels were taken by a CCD camera attached to the Gel Documentation 1000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) equipped with Molecular Analyst software version 1.4 for analysis of the densities of PCR products. The ratio between hBD-2 and GAPDH mRNA expression in each experimental sample and control was calculated and plotted on a bar graph. Each experiment was performed independently at least three times with cell lines derived from different donors, and the ratios were shown by means ± SD. The identity of the amplified products for hBD-3 was verified by DNA sequencing at the Sequencing Facility, Medical Science Research Equipment Center, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand. The identities of the amplified products for hBD-1 and hBD-2 were previously characterized (Krisanaprakornkit *et al.*, 1998, 2000, respectively).

Immunolocalization of hBD-2

To detect the hBD-2 peptide, we grew HGECs on coverslips and incubated them with either 1.20 mM calcium, 1000 nM

thapsigargin, or cell wall extract of *F. nucleatum* (a control for an hBD-2 activator), or left them unstimulated overnight. HGECs were fixed in 4% paraformaldehyde in Sorensen's buffer and permeabilized with cold acetone on ice for 5 min. For immunostaining, cells were blocked with 3% normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 20 min, and then incubated with polyclonal antibody against hBD-2 (1:500) or pre-immune rabbit serum, a generous gift from Dr. Tomas Ganz, Department of Medicine, UCLA, USA. Cells were rinsed, reacted with FITC-conjugated secondary goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) at 1:200 dilution for 30 min, rinsed again, and mounted with Fluorescence Mounting Medium (DAKO, Glostrup, Denmark). Immunofluorescence images were captured by a 3-CCD color video camera (JVC, Victor Company of Japan LTD, Yokohama, Japan) attached to an Olympus epifluorescence microscope model AX70TF (Olympus Optical Co. LTD, Tokyo, Japan). Image capturing was performed with AcQuis software. All computer-generated pictures were organized by Adobe Photoshop 5.0 software on a PowerPC computer.

RESULTS

In cultured HGECs, hBD-2 mRNA expression was induced by high extracellular calcium (0.60 and 1.20 mM) (Fig. 1A). The induction was approximately by three- and four-fold in 0.60 and 1.20 mM calcium, respectively, compared with the hBD-2 mRNA expression in HGECs incubated with 0.03 mM calcium (Fig. 1B). In contrast, hBD-1 and hBD-3 mRNA expression was not affected by high calcium (Fig. 1A). GAPDH served as a control and showed equivalent amounts of RNA between samples (Fig. 1A). Similarly, thapsigargin, an endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase inhibitor, known to release calcium from internal stores, up-regulated hBD-2 mRNA expression in a dose-dependent manner (Fig. 1C). HBD-2 mRNA expression was induced by approximately three-, five-, and six-fold upon incubation with 10, 100, and 1000 nM thapsigargin, respectively, in comparison with hBD-2 mRNA expression in control HGECs (Fig. 1D). However, hBD-1 and hBD-3 mRNA expression was not affected by thapsigargin (Fig. 1C). IL-8 mRNA was induced by both extracellular calcium and thapsigargin in a dose-dependent fashion (Figs. 1A and 1C, respectively). This was consistent with the findings in human colonic epithelial cells (Yu *et al.*, 2001).

The time-course study demonstrated delayed (12 hrs) and rapid (1-3 hrs) hBD-2 mRNA induction in response to stimulation with 1.20 mM calcium and 1000 nM thapsigargin (Figs. 2A and 2B, respectively). Densitometric analyses revealed an increase in hBD-2 expression by two-fold after HGECs were stimulated with thapsigargin within the first 3 hrs, while more delayed hBD-2 induction, *i.e.*, after 12 hrs of stimulation, was seen in HGECs stimulated with calcium (Fig. 2C). Whereas the rapid induction by thapsigargin is similar to that by the cell wall extract of *F. nucleatum* (2-4 hrs), the delayed induction by extracellular calcium is similar to that by the phorbol ester (10 hrs) (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000). This kinetics profile supports our previous findings that suggested involvement of multiple signaling pathways, including 3 MAP kinase pathways, in hBD-2 regulation (Krisanaprakornkit *et al.*, 2002).

A recent study has shown that lipopolysaccharide (LPS)-induced hBD-2 expression in a human airway cell line is dependent on intracellular calcium, since an intracellular calcium chelator diminished the effect of LPS on hBD-2 gene

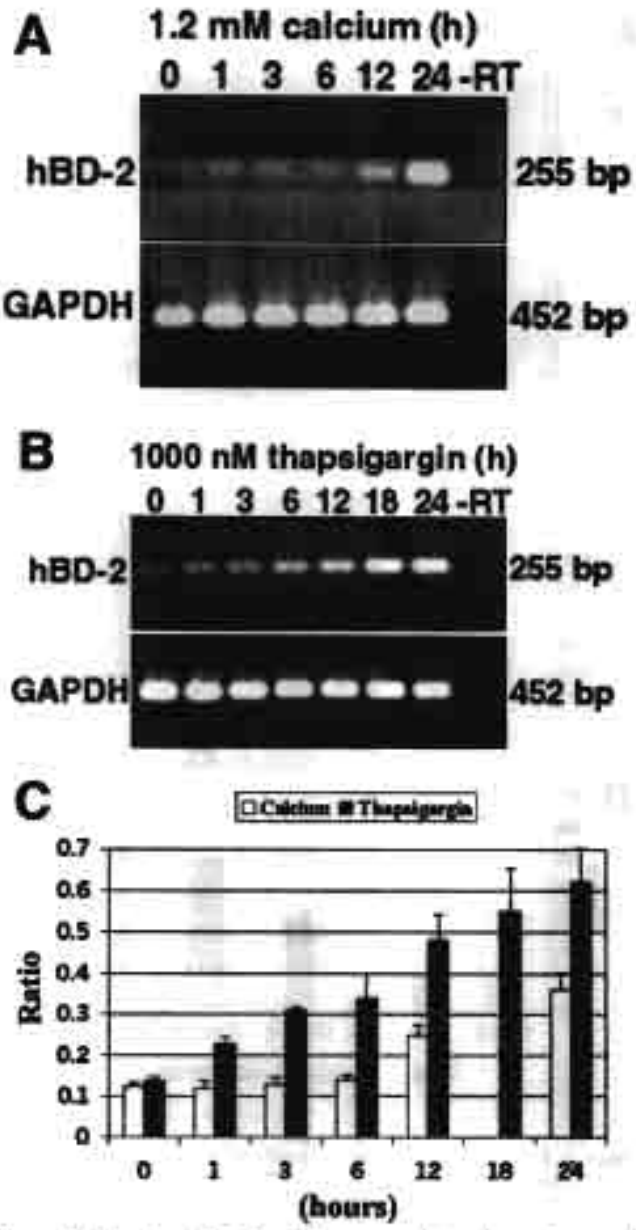


Figure 2. Kinetics of hBD-2 mRNA up-regulation by calcium and thapsigargin. HGECs were stimulated with 1.20 mM extracellular calcium (A) or 1000 nM thapsigargin (B) for the indicated times. RT-PCR analysis was performed as described in MATERIALS & METHODS. (C) Densitometric analysis of RT-PCR in panels A and B. The relative ratios of hBD-2 to GAPDH were determined as described in MATERIALS & METHODS. The *y* axis represents the ratios; the *x* axis represents various incubation periods (hrs) with either calcium (empty bars) or with thapsigargin (filled bars). Note the rapid and delayed hBD-2 mRNA induction by thapsigargin and high calcium, respectively. The results shown are representative of 3 independent experiments.

expression (Tomita *et al.*, 2002). To determine whether the induction of hBD-2 in oral epithelial cells is dependent on an elevated intracellular calcium, we pre-treated HGECs with various doses of BAPTA-AM for 45 min prior to stimulation with either *F. nucleatum* cell wall extract for 6 and 12 hrs, calcium, or thapsigargin for 12 hrs. As shown in Fig. 3, the addition of cell-permeable BAPTA-AM, which chelates

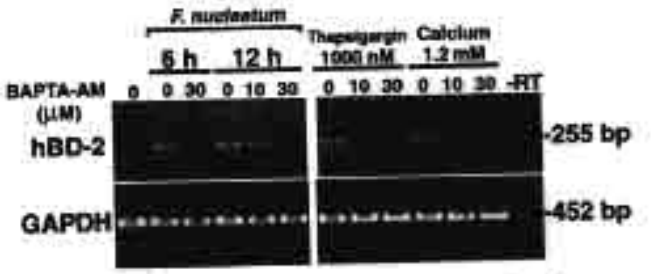


Figure 3. HBD-2 mRNA induction by *F. nucleatum* is dependent on an increase in intracellular calcium. HGECs were pre-incubated with 0, 10, or 30 μM BAPTA-AM for 45 min, and then stimulated with either 10 μg of *F. nucleatum* cell wall extract/mL for 6 and 12 hrs, 1000 nM thapsigargin, or 1.20 mM calcium for 12 hrs, or were left as unstimulated controls. RT-PCR analysis was performed as described in MATERIALS & METHODS. Note that hBD-2 induction by all 3 inducers was completely inhibited by 30 μM BAPTA-AM.

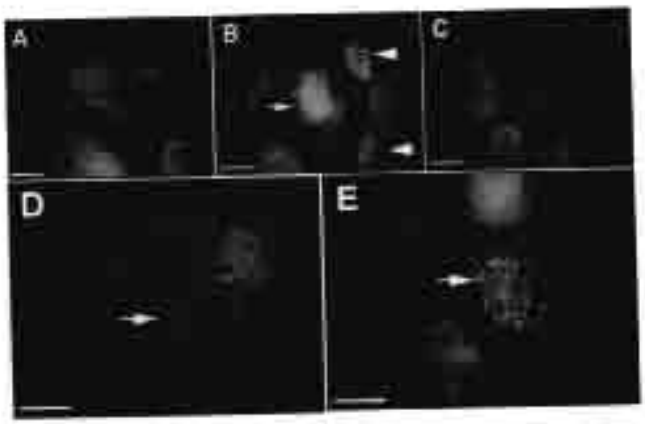


Figure 4. Localization of hBD-2 peptide in stimulated HGECs. HGECs grown on coverslips were unstimulated (A) or stimulated overnight with 10 μg of *F. nucleatum* cell wall extract/mL (B,C), 1.20 mM extracellular calcium (D), or 1000 nM thapsigargin (E). HGECs were fixed and reacted with polyclonal antibody against hBD-2 (A,B,D,E) or pre-immune rabbit serum (C), and fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody as previously described (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000). Bars represent 40 μm. The data shown are representative of 2 separate experiments.

intracellular calcium, inhibited hBD-2 mRNA induction in response to 3 hBD-2 activators in a dose-dependent manner. These results clearly demonstrate that the induction of hBD-2 mRNA in response to bacterial components, high calcium concentration, and thapsigargin is in part dependent on elevation of intracellular calcium by the release of calcium from intracellular stores.

Immunofluorescence showed hBD-2 peptide in the cytoplasm of cultured HGECs stimulated with 10 μg of *F. nucleatum*/mL, 1.20 mM calcium, and 1000 nM thapsigargin overnight (Figs. 4B, 4D, and 4E, respectively). The staining revealed a punctate distribution of hBD-2 peptide in the cytoplasm (arrows). HBD-2 peptide was not detected in every cell (arrowheads), possibly because of variations in staining of individual cells or because hBD-2 peptide is synthesized in a subpopulation of HGECs. Control unstimulated HGECs showed no immunoreactivity against hBD-2 peptide (Fig. 4A). *F. nucleatum*-stimulated HGECs incubated with pre-immune rabbit serum as a negative control showed no reactivity (Fig. 4C).

DISCUSSION

This work explores signaling pathways that regulate β-defensin expression. We have previously shown that expression of both hBD-1 and hBD-2 is associated with differentiation in oral epithelia (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000; Dale *et al.*, 2001), and that hBD-2 up-regulation by the *F. nucleatum* cell wall requires activation of MAP kinase pathways in oral epithelial cells (Krisanaprakornkit *et al.*, 2002). In the present study, we provide evidence that hBD-2 expression in oral epithelial cells is also regulated by calcium, utilizing either high extracellular calcium or intracellular calcium stores released by the endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase inhibitor thapsigargin. In particular, we demonstrated that calcium and thapsigargin stimulated hBD-2 mRNA expression in a dose-dependent fashion and that they induced hBD-2 peptide expression. These *in vitro* data are consistent with the distribution of hBD-2 mRNA and peptide in the suprabasal and granular layers of the epithelium (Dale *et al.*, 2001), where several markers for terminal differentiation are expressed, and a functional barrier, which is regulated by increased calcium concentration, is formed (Lee *et al.*, 1992). High calcium levels of 0.60 and 1.20 mM, used to induce hBD-2 expression in this study, permit more rapid stratification and formation of cornified cell envelopes and up-regulate several genes involved in terminal differentiation of epithelium and epidermis, e.g., profilaggrin, transglutaminase, and involucrin (Eckert *et al.*, 1997). Moreover, we provide evidence that an increase in intracellular calcium is essential for bacterially induced hBD-2 mRNA expression, since BAPTA-AM also blocked hBD-2 up-regulation by the *F. nucleatum* cell wall. Calcium also stimulated expression of the chemokine IL-8 in this system. Therefore, calcium-dependent signal transduction in oral epithelial cells is involved not only in the regulation of normal differentiation, but also in the development of mucosal immunity by stimulating hBD-2 and IL-8.

Our findings are consistent with hBD-2 mRNA regulation by calcium in human primary skin keratinocytes (Liu *et al.*, 2002) and with IL-8 mRNA regulation in human colonic epithelial cells (Yu *et al.*, 2001), but extend these findings to show that hBD-2 up-regulation is not only stimulated by extracellular calcium but is also dependent on elevated intracellular calcium. However, our results differ from previous findings (Frye *et al.*, 2001), which showed that increased extracellular calcium in a keratinocyte cell line induced up-regulated expression of hBD-1 mRNA, but not hBD-2 mRNA. The discrepancy may be due to the keratinocyte cell line used in their study, which differs in many respects from the primary keratinocytes used in this study. In addition, their studies were conducted in confluent cultures (as much as 7-14 days post-confluent), while ours were in cultures that were only 80% confluent.

In contrast to hBD-2 induction, hBD-1 and hBD-3 mRNA expression was not significantly affected by increased calcium concentrations, although we have not examined the peptide levels for these β-defensins. We have previously

shown the association between hBD-1 peptide and differentiation *in vivo*, although the mRNA is detectable in several more epithelial layers than is the peptide (Dale *et al.*, 2001). However, until there is an antibody to the hBD-3 peptide, we cannot examine its localization in the tissue. Furthermore, *in vitro* data may not completely represent the *in vivo* situation, because the mechanisms of epithelial differentiation *in vivo* are far more complex than just the one differentiating factor tested here. Studying other molecular factors that promote epithelial differentiation, such as vitamin D (Bikle *et al.*, 2001), will add to our understanding of mechanisms of β-defensin regulation.

The time-course study shows rapid hBD-2 mRNA induction by thapsigargin that is comparable with that by *F. nucleatum* cell wall extract (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000). This may be because thapsigargin causes an immediate transient rise of intracellular calcium (Jones and Sharpe, 1994). A sustained hBD-2 induction by prolonged incubation with thapsigargin may result from a subsequent calcium influx from the extracellular medium (Tombal *et al.*, 2002) that results in an increase in intracellular free calcium and eventually leads to differentiation (Li *et al.*, 1995). Likewise, a rapid hBD-2 induction by *F. nucleatum* may result from an immediate transient rise of intracellular calcium, while a sustained hBD-2 induction by prolonged stimulation with *F. nucleatum* may result from a calcium influx. The importance of elevated intracellular calcium for hBD-2 up-regulation by *F. nucleatum* is confirmed by the result in Fig. 3, in which 30 μM BAPTA-AM, a cell-permeable calcium chelator, completely inhibits either rapid (6 hrs) or delayed (12 hrs) hBD-2 induction. In contrast to the rapid hBD-2 induction, the delayed hBD-2 induction by increased extracellular calcium (12 hrs), comparable with that by phorbol ester (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000), may be due to the relatively slow rise in intracellular calcium and subsequent differentiation, since these kinetics are similar to phorbol-ester-induced differentiation in keratinocytes (Yuspa *et al.*, 1983).

In conclusion, we have demonstrated that high extracellular calcium concentrations and thapsigargin can increase hBD-2 gene expression in oral epithelial cells, which is dependent on the elevation of intracellular calcium. Likewise, an oral commensal bacterium like *F. nucleatum* that interacts at mucosal surfaces can activate hBD-2 expression through a calcium-dependent pathway. Unraveling the multiple mechanisms involved in the regulation of β-defensins, especially hBD-2, in oral epithelial cells may lead to a better understanding of normal host defense, disease pathogenesis, and the relationships of innate host defenses with epithelial differentiation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Thailand Research Fund (grant no. 4580028 to S.K.). The authors thank Ms. Janet R. Kimball for her assistance on manuscript preparation, and Mr. Toongkam Taya and staff at the Faculty of Medicine, Chiang Mai University, for their technical assistance. We are grateful to all staff at the Department of Oral Surgery, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Thailand. A preliminary report was presented at the 11th Biennial Meeting of the International Association of Oral Pathologists, Singapore, August 5-8, 2002.

REFERENCES

Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG (2001). Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 117:106-111.

Bikle DD, Ng D, Tu CL, Oda Y, Xie Z (2001). Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 177:161-171.

Dale BA (2002). Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol 2000* 30:70-78.

Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R, *et al.* (2001). Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontal Res* 36:285-294.

Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schröder JM, Jepsen S (2002). The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 110:121-124.

Eckert RL, Crish JF, Banks EB, Welter JF (1997). The epidermis: genes on-genes off. *J Invest Dermatol* 109:501-509.

Frye M, Bargon J, Gropp R (2001). Expression of human beta-defensin-1 promotes differentiation of keratinocytes. *J Mol Med* 79:275-282.

Fulton C, Anderson GM, Zasloff MA, Bull R, Quinn AG (1997). Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet* 350:1750-1751.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (1997). A peptide antibiotic from human skin (letter). *Nature* 387:861.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2001). Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707-5713.

Jones KT, Sharpe GR (1994). Thapsigargin raises intracellular free calcium levels in human keratinocytes and inhibits the coordinated expression of differentiation markers. *Exp Cell Res* 210:71-76.

Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA (1998). Expression of the peptide antibiotic human beta defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 66:4222-4228.

Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA (2000). Inducible expression of human beta-defensin-2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and the role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 68:2907-2915.

Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA (2002). Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family. *J Immunol* 168:316-324.

Lee SH, Elias PM, Proksch E, Menon GK, Mao-Qiang M, Feingold KR (1992). Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J Clin Invest* 89:530-538.

Li L, Tucker RW, Hennings H, Yuspa SH (1995). Inhibitors of the intracellular Ca^{2+}-ATPase in cultured mouse keratinocytes reveal components of terminal differentiation that are regulated by distinct intracellular Ca^{2+} compartments. *Cell Growth Differ* 6:1171-1184.

Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, Park CH, Valore EV, Liu L, *et al.* (2002). Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol* 118:275-281.

Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, *et al.* (1999). Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 67:2740-2745.

Menon GK, Elias PM (1991). Ultrastructural localization of calcium in

psoriatic and normal human epidermis. *Arch Dermatol* 127:57-63.

Missero C, Di Cunto F, Kiyokawa H, Koff A, Dotto GP (1996). The absence of p21Cip 1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor 5 progression. *Genes Dev* 10:3065-3075.

Niyonsaba F, Iwabuchi K, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I (2002). Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int Immunol* 14:421-426.

Polakowska RR, Goldsmith LA (1991). The cell envelope and transglutaminase. In: Biochemistry, physiology and molecular biology of the skin. Goldsmith LA, editor. Oxford: Oxford University Press, pp. 168-201.

Tombal B, Denmeade SR, Gillis JM, Isaacs JT (2002). A supramicromolar elevation of intracellular free calcium $[Ca^{2+}]_i$ is consistently required to induce the execution phase of apoptosis. *Cell Death Differ* 9:561-573.

Tomita T, Nagase T, Ohga E, Yamaguchi Y, Yoshizumi M, Ouchi Y (2002). Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad). *Respirology* 7:305-310.

Valore EV, Park CH, Quayle A, Wiles KR, McCray PB Jr, Ganz T (1998). Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101:1633-1642.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, *et al.* (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286:525-528.

Yu Y, De Waele C, Chadee K (2001). Calcium-dependent interleukin-8 gene expression in T84 human colonic epithelial cells. *Inflamm Res* 50:220-226.

Yuspa SH, Ben T, Hennings H (1983). The induction of epidermal transglutaminase and terminal differentiation by tumor promoters in cultured epidermal cells. *Carcinogenesis* 4:1413-1418.

Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR (1989). Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations *in vitro*. *J Cell Biol* 109:1207-1217.

Zhao C, Wang I, Lehrer RI (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 396:319-322.

การศึกษานำร่องหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของจุลชีพก่อโรคปริทันต์ห้าชนิดและระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์

The pilot study of association between the quantities of five periodontopathic pathogens and the Levels of periodontal pocket depth

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ
สาครรัตน์ คงขุนเทียน
ธีรวิช โชติพานิช
รัตนา อัมไพรวรรณ

สำเนาการพิมพ์จากวิทยาสารทันตแพทยศาสตร์
ปีที่ ๕๓ ฉบับที่ ๕-๖ กันยายน-ธันวาคม ๒๕๔๖
หน้า ๓๙๑-๔๐๕
Reprinted from the Journal of the Dental Association of Thailand
Volume 53 Number 5-6 September-December 2003
pp. 391-405

The pilot study of association between the quantities of five periodontopathic pathogens and the Levels of periodontal pocket depth

Suttichai Krisanaprakornkit, Sakornrat Khongkhunthian**, Teerawich Chotipanich***, Rattana Umpriwan***

Abstract

The objective of this study was to determine the association between the quantities of five periodontal pathogens and the levels of probing depth, indicative of the level of periodontal destruction. Subgingival plaque samples were collected using paper points from both shallow (≤ 4 mm) and deep (≥ 6 mm) pockets of six aggressive periodontitis (AP) and six chronic periodontitis (CP) patients. Microbial DNA was isolated according to a standard protocol, and amplified by polymerase chain reaction (PCR) with specific primer pairs for individual microorganisms. Densitometry was conducted to analyze the intensities of PCR products, as a representative of the quantities of pathogens, from both shallow and deep pockets. The results showed that all microbial DNA tested, including *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a.*), *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*), *Prevotella intermedia* (*P.i.*), *Bacteroides forsythus* (*B.f.*), *Treponema denticola* (*T.d.*), could be identified by PCR technique. The median intensities of *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.* were significantly associated with the deep pocket in both AP (p = 0.001, 0.001, and 0.001, respectively) and CP (p = 0.001, 0.007, and 0.017, respectively) patients, while those of *P.i.* and *A.a.* were significantly associated with the deep pocket only in AP patients (p = 0.001 and 0.017, respectively). The median intensities of *P.i.* and *A.a.* were not significantly associated with the deep pocket in CP patients (p = 0.114 and 0.887, respectively). Our data suggest that the quantities of *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.* are associated with periodontal destruction in both AP and CP and may be used as a prognostic marker for the severity and progression of periodontal disease.

Key words: periodontitis; periodontal pathogens; pocket depth; polymerase chain reaction

Introduction

Periodontal disease, a multifactorial disorder, in which several microbial species, particularly Gram-negative anaerobic or facultative anaerobic bacteria, such as *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a.*), *Bacteroides forsythus* (*B.f.*), *Prevotella intermedia* (*P.i.*), *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) as well as spirochetes, *Treponema denticola* (*T.d.*), are suspected as major pathogens in destructive periodontitis [1-3]. *A.a.* plays a significant role in the pathogenesis of localized juvenile periodontitis as well as some forms of severe periodontitis in adults [4] although it may be detected in dental plaque of a significant percentage (17 to 41%) of healthy individuals, constituting a persistent portion of the normal flora [5, 6]. Among different isolates, *A.a.* can produce various levels of leukotoxin that specifically lyzes human neutrophils [7, 8]. It has been shown that the molecular mechanism of high level of leukotoxin production is based on a 530 base pair (bp) deletion in the region upstream of the leukotoxin gene operon (*ltx*), encoding the toxin [9]. Recently, this highly leukotoxic clone of *A.a.* has been shown to be associated with early-onset periodontitis, suggesting a significant role of *A.a.*,

* Department of Odontology-Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200
** Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200
*** Post-graduate student, Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

especially the highly leukotoxic clone, in periodontal destruction [9].

P.g. is a second intensively studied periodontal pathogen, and reportedly associates with adult and rapidly progressive periodontitis [10]. *P.g.* has been shown to be reduced in successfully treated sites but is commonly encountered in sites that exhibit recurrence of disease post-therapy, suggesting its important role in destructive periodontal disease, particularly at the active progressing site [11]. *B.f.* was first described in 1979 [12]. It is found in higher numbers in sites of destructive periodontal disease than in gingivitis or healthy sites [13]. In addition, *B.f.* is detected more frequently and in higher numbers in active periodontal lesions than inactive lesions [14]. There have also been several recent studies, involving non-cultural methods of enumeration, such as DNA probes or immunological methods, which demonstrate the significant microbial risk factor of *B.f.* that distinguishes subjects with periodontitis from those who are periodontally healthy [15,16]. *T.d.*, a Gram-negative, anaerobic, highly motile spirochete, has been found more commonly in periodontally diseased than healthy or gingivitis sites and in subgingival than supragingival plaque [17]. The data about other subgingival species in the pathogenesis of destructive periodontal diseases are more limited, but these organisms appear to merit further investigation. Among these species, *P.i.*, a Gram-negative, short, round-ended anaerobic rod bacterium, was shown to be elevated in certain forms of periodontitis [18]. However, *P.i.* is still considered a second group of microbial species closely related to periodontal disease, while *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.* are considered a triad of periodontopathic organisms, strongly associated with chronic and rapidly progressive periodontitis in adults. Accurate quantification of periodontal pathogens in subgingival plaque is therefore needed for understanding the etiologic role of these pathogens in periodontal disease.

The objective of this study was to determine the association of these periodontal pathogens with the levels of probing depth, i.e. shallow (≤ 4 mm) versus deep (≥ 6 mm) pockets, by using the conventional PCR, a non-cultural technique, to semi-quantify periodontal pathogens in the pockets. Currently, the 16S rRNA-based PCR, which uses a specific primer pair for each microorganism, seems to be the most sensitive and rapid method for determining the prevalence of such a microorganism. Furthermore, in this study, the presence of highly leukotoxic clone of *A.a.*, characterized by a 530 bp-deletion in the *ltx* operon, was investigated in both aggressive and chronic periodontitis.

Materials and Methods

Subjects

Six aggressive periodontitis (AP) patients, whose ages ranged from 19 to 42 years, and six chronic periodontitis (CP) patients, whose ages ranged from 45 to 66 years, were recruited in this study. The diagnoses of AP and CP were made according to the classification of the American Academy of Periodontology, 1999. The exclusion criteria were previous uses of antibiotics and/or periodontal treatment within 3 months prior to sample collection, smokers, pregnant women, and patients with underlying systemic disease, e.g. diabetes mellitus etc. The method of collecting subgingival plaque samples, possible risks of infection, and benefits were thoroughly explained, and a written consent was obtained from individual patients. The research design was approved by the Faculty of Dentistry Committee on Studies Involving Human Beings, Chiang Mai University.

Sample Collection

To first verify the methods of DNA isolation and PCR, twenty-nine paper points were inserted into the periodontal pockets of an aggressive periodontitis patient (subject #0; 39 years old), regardless of the probing depth levels. All paper points were then transferred to a 1.5-ml microcentrifuge tube, and the methods of DNA isolation and PCR were followed as described below.

To determine the association of periodontal bacteria with the levels of probing depth, subgingival plaque samples were collected from selected pockets. Two shallow pockets (periodontal probing depth ≤ 4 mm) and two deep pockets (periodontal probing depth ≥ 6 mm) were selected from different quadrants within the same patient. The sampling sites were isolated with sterile cotton rolls. Supragingival plaque was removed with a cotton pellet, and then air-dried. Two sterile paper points were inserted into a selected pocket until resistance was felt. The paper points were left in the pocket about 30 sec, and then transferred to a 1.5-ml microcentrifuge tube, containing 80 µl of proteinase K buffer (12 mM Tris-HCl pH 8.0, 6 mM EDTA, 0.6% sodium dodecyl sulfate). The tube was vigorously vortexed several times to lyze bacterial cells, and 20 µl of proteinase K (20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH

8.0) (GIBCO BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) was then added to digest protein and deoxyribonuclease (DNase). The samples were incubated in a water bath at 55°C for 15 min with occasional mixing.

Bacterial DNA Isolation

After incubation with proteinase K, bacterial DNA was isolated by DNA extraction columns from a GFX™ Genomic Blood DNA Purification kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA) according to the manufacturer's instruction. Briefly, 500 µl of the extraction buffer (Amersham) was added into samples, and the whole volume was then transferred to the columns, which were centrifuged at 5,000 g for 1 min at room temperature. The columns were washed twice with 70% ethanol, and DNA was eluted from columns with 100 µl of pre-heated Tris-EDTA buffer, containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA.

Polymerase Chain Reaction (PCR) and Gel Electrophoresis

Ten percent (= 10 µl) of bacterial DNA samples was amplified by PCR in a total volume of 50 µl, including 5 µl of 10X PCR buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1.5 µl of 50 mM $MgCl_2$ (Invitrogen), 1µl of 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 0.25 µl of *Taq* DNA polymerase (5 units/µl) (Invitrogen), and 1 µl of each forward and reverse primer. All primers used in this study were generous gifts from Prof. Isao Ishikawa and Dr. Makoto Umeda, Department of Hard Tissue Engineering (Periodontology), Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, and their sequences as well as the predicted sizes of PCR products were listed in Table 1. The ubiquitous primers (Table 1), which match most of all bacterial 16S

Table 1: Primer sequences and sizes of PCR products

Primers for bacteria	Sequences (5' → 3')	Predicted sizes (bp)
A.a. (forward)	AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC	557
A.a. (reverse)	ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT	
ltx (forward)	TTT CTC CAT ATT AAA TCT CCT TGT	495 for high*
ltx (reverse)	CAG ATC AAA ACC TGA TAA CAG TAT T	1,025 for low**
B.f. (forward)	GCG TAT GTA ACC TGC CCT CA	641
B.f. (reverse)	TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	
P.g. (forward)	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG	641
P.g. (reverse)	ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	
P.i. (forward)	TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG	585
P.i. (reverse)	TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	
T.d. (forward)	TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T	316
T.d. (reverse)	TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	
Ubiquitous (forward)	GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC	602
Ubiquitous (reverse)	CCC GGG AAC GTA TTC ACC G	

* A 495-bp PCR product is due to a 530-bp deletion in the leukotoxic gene operon, which is a characteristic of the high toxicity clone of *A.a.* [5].
** A 1,025-bp PCR product is the low toxicity clone of *A.a.* [5].

ribosomal RNA (rRNA) at the same position but not 18S rRNA sequence of eukaryotic cells, served as a positive control to indicate relatively equal amount of bacterial DNA used for PCR in each sample. The conditions of PCR were denaturing temperature at 95°C 45 sec; annealing temperature at 60°C 45 sec; and polymerizing temperature at 72°C 1 min for 30 cycles. PCR was conducted in a Mastercycler Gradient thermal cycler (Eppendorf, Germany). The PCR products were resolved on 1.2 % agarose gel (GIBCO BRL) in 1X Tris-Boric EDTA buffer (Amresco, Solon, OH, USA) at 80 volts for 100 min, stained with ethidium bromide (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and visualized under ultraviolet illumination. Gel photographs were taken by a Gel Documentation System (Gel Doc 1000) (Bio-Rad) and a thermal printer (Mitsubishi, Tokyo, Japan), and the pictures were combined and modified by Photoshop software version 5.0. The intensities of PCR products were analyzed by Molecular Analyst software version 1.4 (Bio-Rad), and the median intensities as well as 25th and 75th percentiles for either twelve shallow pockets or twelve deep pockets in each disease group, i.e. AP or CP, were calculated and shown in the box plot for each periodontal bacterium.

Statistical Analysis

To determine whether the median intensities of PCR products, as a representative of the quantities of periodontal bacteria, were associated with deep pockets in either an AP patient group or a CP patient group, data were analyzed by the Mann-Whitney U test using the statistical package for social sciences (SPSS) version 10.0 for Windows.

Results

Microbial Identification by PCR from Subgingival Plaque Samples

To verify the methods of DNA isolation and PCR, twenty-nine paper points were inserted into different sites of periodontal pockets of an aggressive periodontitis patient (subject #0), and were then pooled in the same tube. The result showed that all periodontal pathogens tested in this study, including *A.a.*, *P.g.*, *B.f.*, *P.i.*, and *T.d.*, could be detected by PCR (Fig. 1). The sizes of PCR products in Fig.1 were as predicted and listed in Table 1. Interestingly, only could the low toxicity but not the high toxicity clone of *A.a.* be detected in this patient with the predicted size of 1,025 bp (an *ltx* lane in Fig. 1).

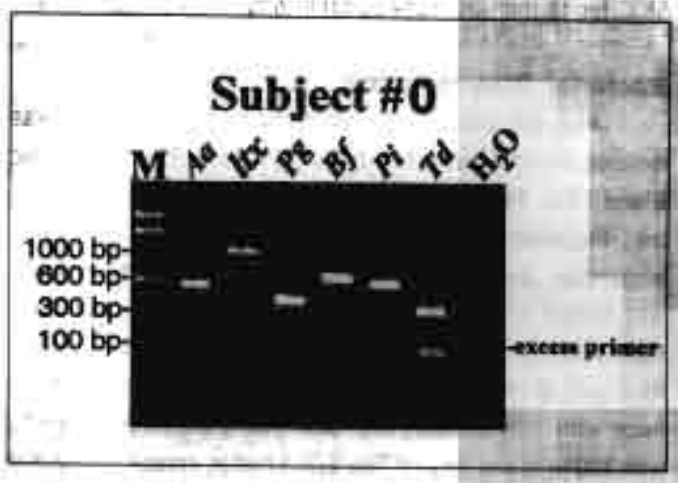


Fig. 1 Microbial identification by PCR in an AP patient (Subject #0). PCR was conducted for 30 cycles using a specific primer pair for each microorganism, including A.a. (Aa), P.g. (Pg), B.f. (Bf), P.i. (Pi), and T.d. (Td). The low toxicity clone of A.a. (an ltx lane) was detected in this patient with the predicted size of 1,025 base pairs (bp). Water (no DNA template) served as a negative control for PCR (in H_2O lane). M = 100 bp DNA ladder (GIBCO BRL), which ran along with samples. Note excess amount of primers ran below 100 bp.

Association of Periodontal Pathogens with Periodontal Pocket Depth

To determine whether the prevalence and quantity of each periodontal pathogen were associated with deep pockets, two shallow pockets and two deep pockets were selected from six AP and six CP patients. Two sterile paper points were inserted into each pocket, and the DNA isolation, PCR, and densitometric analyses were performed as described in Materials and Methods. Regardless of the pocket depth, *P.g.*, *B.f.*, *T.d.*, and *P.i.* could be detected in all six AP patients (Fig. 2), whereas only could *P.g.* and *B.f.* be detected in all six CP patients (Fig. 3). On the other hand, *A.a.* could not be detected in every AP and CP patient (Fig. 2 and 3, respectively). Interestingly, identical to the result in Fig. 1, the low toxicity clone (*ltx*) of *A.a.*, as a subset of *A.a.*, was only detected with the predicted size of 1,025 bp (Fig. 2 and 3, respectively). The result from using a primer pair to amplify bacterial 16S ribosomal RNA (*Ubi*) showed a predicted 602-bp PCR product in every sample (the lowest band in Fig. 2 and 3), indicating that approximately equal amount of DNA template from every sample was used in PCR. Note that upper bands in Fig. 2 and 3 were non-specific PCR products,

whose sequences were not determined in this study. There was no PCR product in a negative control (a -ve lane, the most right lane in Fig. 2 and 3), where two sterile paper points were used instead.

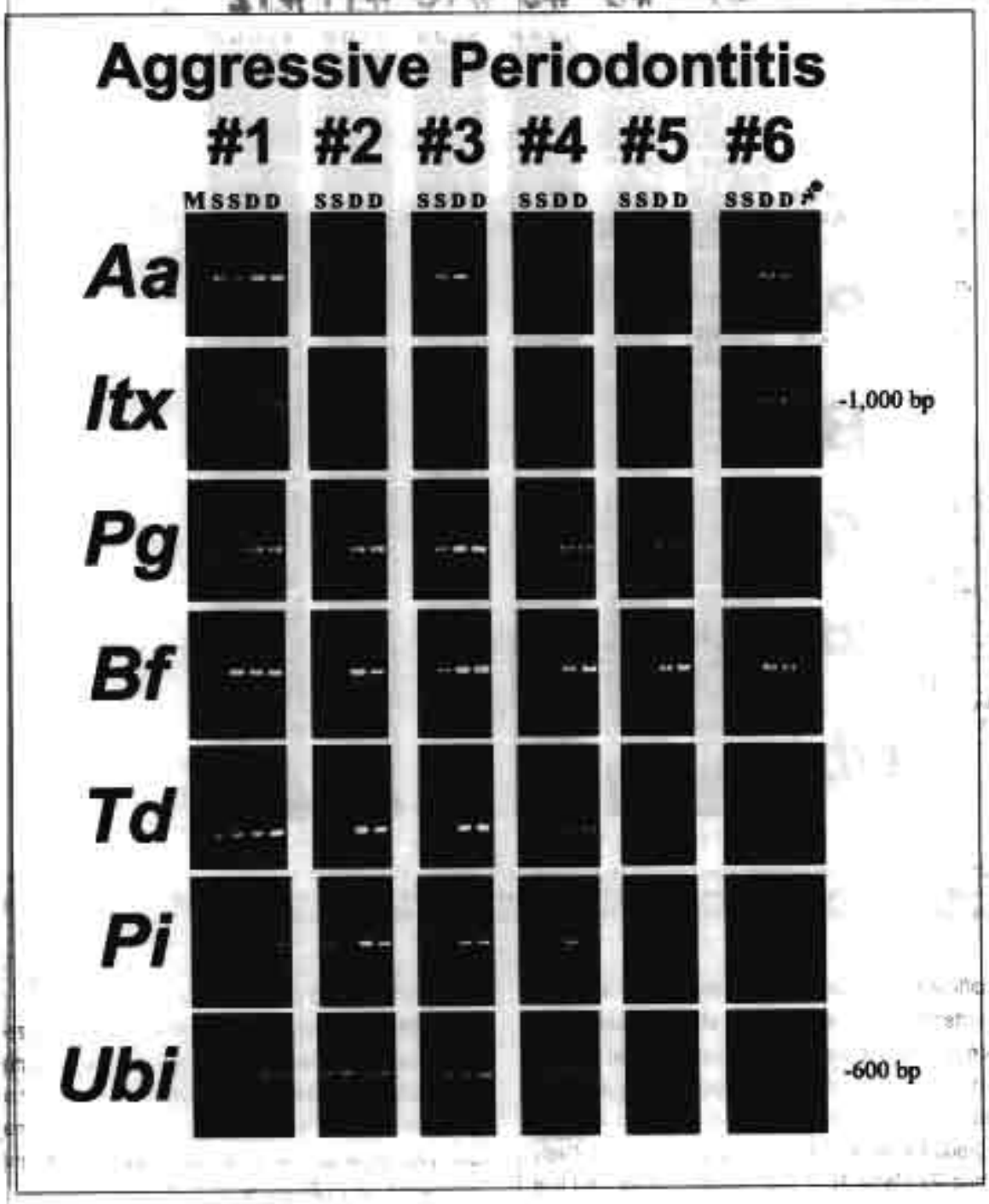


Fig. 2 Association of periodontal pathogens with the levels of probing depth in six aggressive periodontitis (AP) patients (#1-#6). Subgingival plaque samples were collected from two shallow (S) and two deep (D) pockets within each patient. -ve was a negative control where two sterile paper points (without being inserted into the pocket) were simultaneously processed along with experimental samples. Note while P.g., B.f., T.d. and P.i. could be detected from the pockets of all patients, A.a. could not. Interestingly, the low toxicity clone of A.a. was detected in 5 out of 6 AP patients with the predicted size of 1,025 bp in an Itx panel. Bacterial 16S ribosomal RNA (Ubiquitous) served as a positive control (the lowest band around 600 bp in each lane in a Ubi panel), showing that approximately equal amount of DNA template was used in PCR for every sample. Upper bands in each lane were non-specific PCR products.

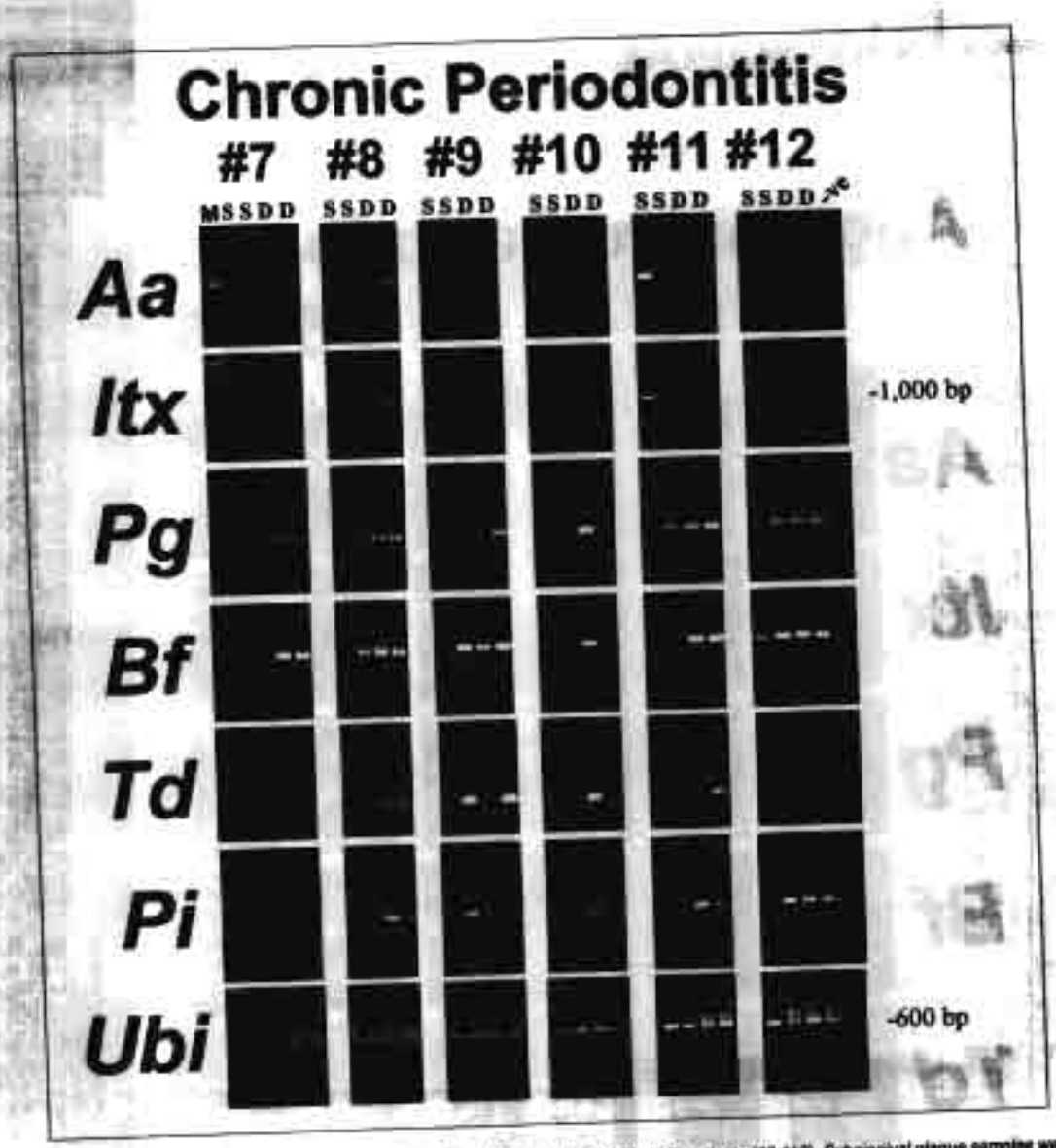


Fig. 3 Association of periodontal pathogens with the levels of probing depth in six chronic periodontitis (CP) patients (#7-#12). Subgingival plaque samples were collected from two shallow (S) pockets and two deep (D) pockets within each patient. Note while P.g. and B.f. could be detected from the pockets of all patients, T.d., P.i., and A.a. could not. The low toxicity clone of A.a. was only detected in 3 out of 6 CP patients with the predicted size of 1,025 bp in an Itx panel.

The difference between the percentage of microbial detection in deep pocket and that in shallow pocket was evident in an AP patient group for all five microbial species tested (Table 2). However, this difference was only apparent in some specific microorganisms, i.e. *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.*, in a CP patient group (Table 3), and the difference was relatively less in *A.a.* and *P.i.* (Table 3). These results may suggest that specific bacteria, particularly *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.*, a triad of periodontopathic microorganisms, are involved with the pathogenesis of any types of periodontal disease, while the role of *P.i.* and *A.a.* in the pathogenesis of periodontal disease may be more restricted to an aggressive type.

The intensities of PCR products were analyzed by densitometry, and all data from six AP and six CP patients were summarized in Table 4 and 5, respectively, and shown in the box plot format (Fig. 4) for each periodontal pathogen. The box plot showed that, in an AP patient group, the median intensities of PCR products from deep pockets were evidently greater than those from shallow pockets in all microorganisms, including *P.g.*, *B.f.*, *T.d.*, *P.i.*, and *A.a.* (Fig. 4A, B, C, D, and E, respectively). In a CP patient group, the median intensities of PCR products from deep pockets were clearly

greater than those from shallow pockets in *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.* (Fig. 4 F, G, and H, respectively), but not in *P.i.* and *A.a.* (Fig. 4 I and J, respectively). The statistical analyses using the Mann-Whitney U test showed that the quantities, represented by the median intensities of PCR products, of *P.g.*, *B.f.*, *T.d.*, *P.i.*, and *A.a.*, were significantly associated with deep pockets in AP patients ($p = 0.001$, 0.001, 0.001, 0.001, and 0.017, respectively). However, only were the quantities of *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.* significantly associated with deep pockets in CP patients ($p = 0.001$, 0.007, and 0.017, respectively), while the quantities of *P.i.* and *A.a.* were not significantly associated with deep pockets ($p = 0.114$ and 0.887, respectively).

Table 2 *The prevalence of periodontal bacteria in either shallow or deep pockets from **AP** patients in Fig. 2, as expressed by the percentage of microbial detection (presence of PCR products) in the total of 12 sites.*

Microbial species	Presence of PCR products in shallow pockets (n =12) (Percentage)	Presence of PCR products in deep pockets (n = 12) (Percentage)	Difference between deep and shallow pockets
A.a.	3/12 (25.0%)	9/12 (75.0%)	50.0%
P.i.	7/12 (58.3%)	11/12 (91.7%)	33.4%
P.g.	6/12 (50.0%)	12/12 (100.0%)	50.0%
B.f.	6/12 (50.0%)	12/12 (100.0%)	50.0%
T.d.	4/12 (33.3%)	12/12 (100.0%)	66.7%

Table 3 *The prevalence of periodontal bacteria in either shallow or deep pockets from **CP** patients in Fig. 3, as expressed by the percentage of microbial detection (presence of PCR products) in the total of 12 sites.*

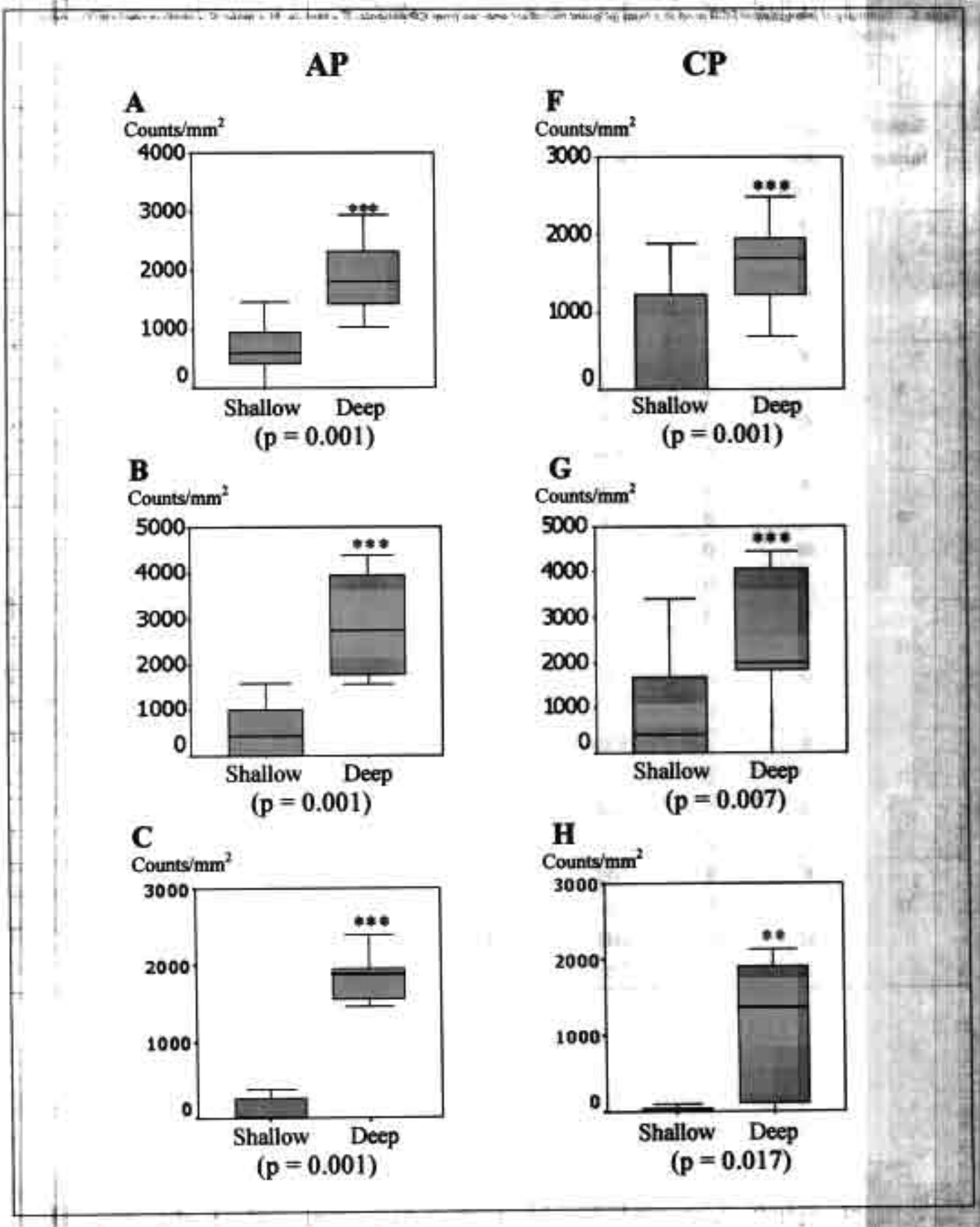
Microbial species	Presence of PCR products in shallow pockets (n =12) (Percentage)	Presence of PCR products in deep pockets (n = 12) (Percentage)	Difference between deep and shallow pockets
A.a.	4/12 (33.3%)	4/12 (33.3%)	0.0%
P.i.	7/12 (58.3%)	9/12 (75.0%)	16.7%
P.g.	5/12 (41.7%)	12/12 (100.0%)	58.3%
B.f.	7/12 (58.3%)	11/12 (91.7%)	33.4%
T.d.	3/12 (25.0%)	9/12 (75.0%)	50.0%

Table 4 Summary of intensities of PCR products from different microbial species from AP patients. F = female; M = male; S = shallow pockets; D = deep pockets

Subject Number	Sex Age (years)	S or D	*A.a.* Intensities counts/mm²	*P.i.* Intensities counts/mm²	*P.g.* Intensities counts/mm²	*B.f.* Intensities counts/mm²	*T.d.* Intensities counts/mm²
1	F 34	S	1,198	585	841	1,000	1,324
		S	1,097	605	937	1,597	1,567
		D	1,510	76	1,018	1,815	1,831
		D	1,497	738	1,256	1,673	1,824
2	F 42	S	0	779	942	0	371
		S	0	710	565	314	0
		D	0	1,192	1,447	1,884	1,942
		D	105	1,172	1,407	1,951	1,930
3	F 30	S	0	0	0	0	0
		S	1,038	240	1,483	1,504	149
		D	1,353	1,116	2,059	1,763	1,943
		D	51	1,113	1,765	1,563	1,953
4	F 35	S	0	0	537	0	0
		S	0	0	494	0	0
		D	0	2,907	2,929	4,079	2,220
		D	0	994	2,725	4,392	2,400
5	M 32	S	0	1,105	623	801	0
		S	0	431	1,100	1,028	0
		D	445	1,484	2,453	3,943	1,508
		D	1,278	0	2,193	3,958	1,582
6	M 19	S	0	0	327	529	0
		S	0	0	0	0	0
		D	2,311	2,339	1,842	3,809	1,523
		D	1,851	1,479	1,494	3,514	1,464

Table 5 *Summary of intensities of PCR products from different microbial species from CP patients. F = female; M = male; S = shallow pockets; D = deep pockets*

Subject Number	Sex Age (years)	S or D	*A.a.* Intensities counts/mm²	*P.i.* Intensities counts/mm²	*P.g.* Intensities counts/mm²	*B.f.* Intensities counts/mm²	*T.d.* Intensities counts/mm²
7	F 65	S	0	0	0	0	0
		S	0	0	0	0	0
		D	0	0	1,880	4,428	1,540
		D	0	0	1,717	4,243	1,171
8	F 45	S	0	0	0	0	0
		S	62	249	1,877	3,390	1,525
		D	0	3,048	2,211	4,237	2,000
		D	1,644	1,578	2,469	3,885	2,084
9	F 66	S	0	0	0	687	0
		S	0	1,035	0	1,971	1,935
		D	0	112	1,071	1,757	229
		D	0	612	1,668	1,558	1,811
10	M 45	S	0	665	0	156	0
		S	0	112	30	0	0
		D	0	729	2,004	2,155	2,021
		D	0	0	686	0	0
11	F 46	S	1,639	0	0	0	0
		S	47	270	1,456	653	86
		D	456	1,504	1,604	1,996	207
		D	61	825	1,885	1,913	1,766
12	F 52	S	127	502	1,150	1,396	0
		S	0	1,319	1,308	2,031	0
		D	142	1,105	1,237	2,014	0
		D	0	1,092	1,200	1,885	0


AP
CP
A
Counts/mm²
4000
3000
2000
1000
0
***
Shallow
Deep
(p = 0.001)
F
Counts/mm²
3000
2000
1000
0
***
Shallow
Deep
(p = 0.001)
B
Counts/mm²
5000
4000
3000
2000
1000
0
***
Shallow
Deep
(p = 0.001)
G
Counts/mm²
5000
4000
3000
2000
1000
0
***
Shallow
Deep
(p = 0.007)
C
Counts/mm²
3000
2000
1000
0
***
Shallow
Deep
(p = 0.001)
H
Counts/mm²
3000
2000
1000
0
**
Shallow
Deep
(p = 0.017)

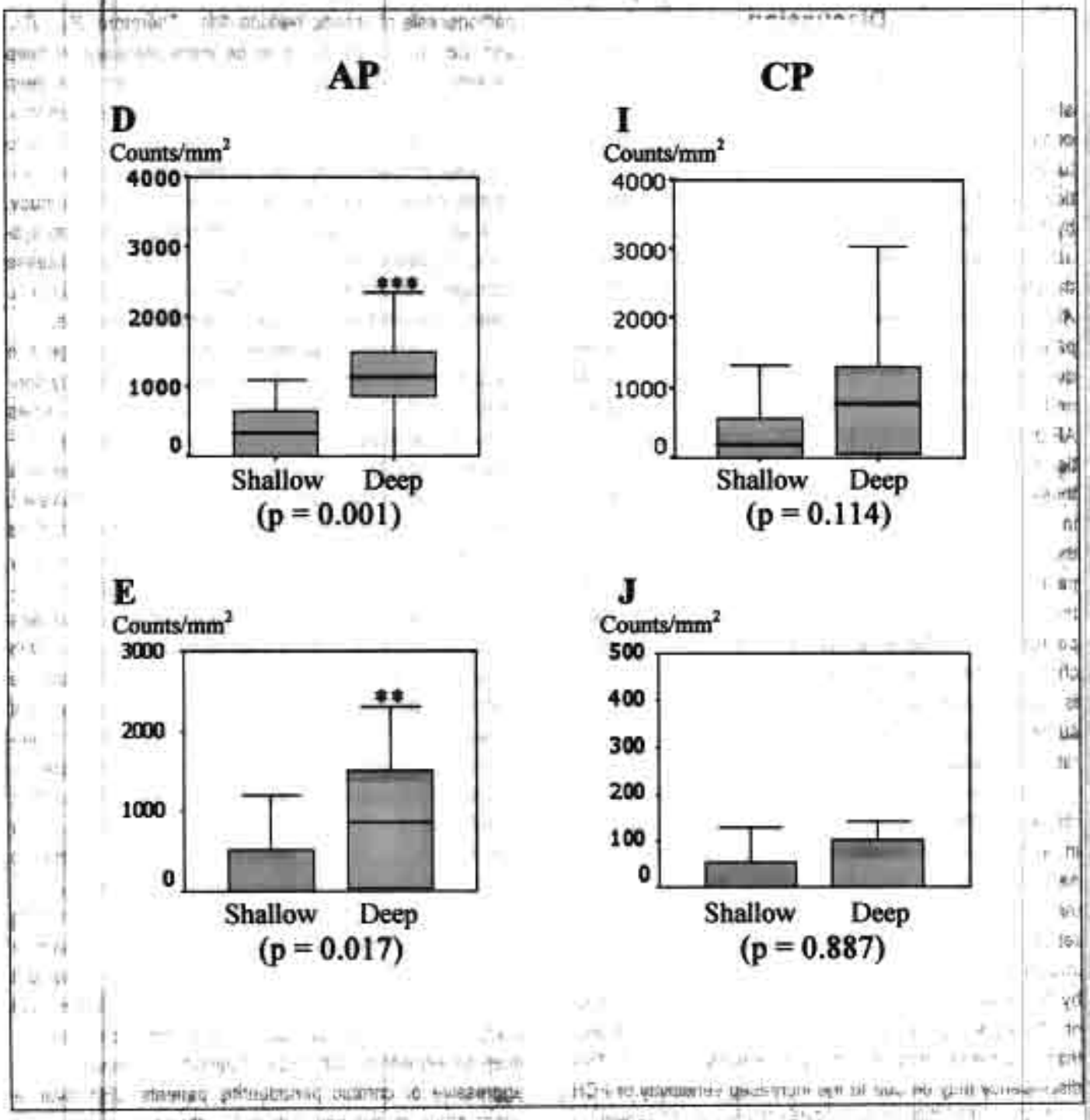


*Fig. 4 The box plots show the median intensities as well as 25th and 75th percentiles of PCR products from aggressive periodontitis (AP) for P.g. (A), B.f. (B), T.d. (C), P.i. (D), and A.a. (E) and chronic periodontitis (CP) for P.g. (F), B.f. (G), T.d. (H), P.i. (I), and A.a. (J). The median intensities (counts/mm²) of DNA bands on y axis were calculated from twelve shallow pockets or twelve deep pockets in either AP or CP patients for each periodontal microorganism, summarized in Table 4 and 5, respectively. The box plots demonstrated that the median intensities of PCR products in P.g., B.f., and T.d. were greater in deep than shallow pockets in both AP and CP, while those in P.i. and A.a. were greater in deep than shallow pockets only in AP. ** = significantly associated at 0.01<p≤0.05; *** = significantly associated at 0.001<p≤0.01.*

Discussion

In this pilot study, we have shown several findings about the association of periodontal pathogens with periodontal destruction by using conventional PCR, a non-cultural technique, as a screening tool to examine the association. First, the quantities of *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.*, as represented by the intensities of PCR products, are significantly associated with deep pockets whose levels are equal to or greater than 6 mm in both AP and CP patients, while those of *P.i.* and *A.a.* are significantly associated with deep pockets only in AP patients. Second, *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.* are found more frequently in deep pockets than in shallow pockets in both AP and CP patients, whereas *A.a.* and *P.i.* are found more only in AP patients. These suggest that, in addition to the association of the quantities of *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.* with deep pockets, these three microorganisms are more prevalent in deep than in shallow pockets in both AP and CP patients. Third, only is the low toxicity clone of *A.a.* detected in all AP and CP patients. This finding is consistent with others obtained from the study in Caucasians in northern Europe and Asian population [19-21]. This is because the highly leukotoxic clone, characterized by a 530-bp deletion of the operon of *ltx* gene, is primarily found among adolescents of African origin who suffer from juvenile periodontitis, suggesting the age and racial predilection of the highly leukotoxic clone [5, 22].

In comparison with the findings from other studies, the results from this study are comparable to theirs. For example, in rapidly progressive periodontitis, *P.g.* is found to predominate in periodontal lesions with clinical probing depth > 6 mm, followed by *B.f.*, *P.i.*, and *A.a.* [23]. In this study, similar results are found, i.e. *P.g.* and *B.f.* are found to predominate in deep pockets with clinical probing depth ≥ 6 mm, followed by *P.i.* and *A.a.* However, in this study, *A.a.* is found in 9 out of 12 deep pockets in aggressive periodontitis (75.0%), higher than the results from the study of Kamma *et al.* [23]. This discrepancy may be due to the increased sensitivity of PCR method used in this study to detect bacteria. Moreover, in juvenile periodontitis, *P.g.* is found in 31 of 36 diseased sites (86.1%), followed by *P.i.* (77.8%) and *A.a.* (25%) [24], and these results are consistent with our findings in Table 2. The findings from Table 3, which show that the detectable low toxicity clone of *A.a.* and *P.i.* are almost equally found in both shallow and deep pockets in chronic periodontitis, suggest that *A.a.* and *P.i.* may not play a pivotal role in the disease pathogenesis of chronic periodontitis. Therefore, *P.g.*, *B.f.*, and *T.d.*, which are found to be more prevalent in deep pockets and whose quantities are associated with deep pockets in both AP and CP patients, should be selected for a future thorough investigation. Nevertheless, in addition to the polymicrobial factor, other predisposing factors to periodontal disease, which are beyond the scope of this study, such as host responses, genetic influences, underlying systemic conditions etc., are equally important in the disease pathogenesis, and should also be completely examined to better understand the etiologies of periodontal disease.

To represent the quantities of periodontal pathogens in the pocket, the intensities of DNA bands generated by conventional PCR (endpoint PCR) are determined. The values of band intensities as expressed in the unit of counts/mm^2 may not precisely represent the accurate number of bacteria in the pocket as expressed in the unit of cells/ml. However, the conventional PCR is the most sensitive and rapid method to screen some candidate microbial species that possibly involve with the severity or progression of any types of periodontal disease, before more accurate quantitative analyses will be used to determine the exact number of bacteria. With the advent of advanced technology, real-time PCR using the LightCycler system that allows monitoring of the exponential phase has been used to rapidly detect and accurately quantify periodontal pathogens in subgingival plaque samples [25]. Real-time PCR has some advantages over conventional PCR, including analysis of more samples at a time and a shorter analytical period. Consequently, it now becomes feasible to conduct a large population study regarding periodontal pathogens in several aspects with real-time PCR. In addition to substituting conventional PCR with real-time PCR, the sample size should be increased by recruiting more aggressive and chronic periodontitis patients in a future study. In this pilot study, we analyze the correlation of periodontal bacteria with deep pocket within each group of periodontal disease, i.e. in aggressive or chronic periodontitis patients. However, a larger study is required before the threshold numbers of various microbial species, associated with different levels of probing depth, can be determined within a specific group of periodontitis.

In this study, we have established the protocols for microbial DNA isolation from subgingival plaque samples and for PCR to amplify the specific microbial DNA using a specific primer pair. These techniques may be applied for a large

นทริทยาการ

การศึกษานำร่องหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของจุลชีพก่อโรคปริทันต์ห้าชนิดและระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ*, สาครรัตน์ คงชุนเทียน**, ธีรวิช โชติพานิช***, รัตนา อัมไพรวรรณ**

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของจุลชีพก่อโรคปริทันต์และระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์ ซึ่งบ่งบอกถึงระดับการทำลายอวัยวะปริทันต์ โดยใช้แท่งกระดาษซับขนาดเล็กเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจากทั้งร่องลึกปริทันต์ที่ตื้น (≤ 4 มม.) และลึก (≥ 6 มม.) ของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรง 6 คนและชนิดเรื้อรัง 6 คน สารพันธุกรรมของจุลชีพถูกสกัดตามวิธีมาตรฐาน และถูกขยายเพิ่มจำนวนด้วยวิธีโพลีเมอเรสเชนรีแอ็คชั่น (พีซีอาร์) ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับจุลชีพก่อโรคปริทันต์แต่ละชนิด ทำการวิเคราะห์หาค่าความเข้มของแถบสารพันธุกรรมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์และเป็นตัวแทนของปริมาณจุลชีพจากร่องลึกปริทันต์ที่ลึกและตื้น พบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของจุลชีพที่ทำการทดสอบได้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ แอคทิโนบาซิลลัส แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส พรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย แบคทีรอยดีส์ ฟอร์ซัยธัส และทริโปเนมา เดนติโคลา ด้วยวิธีพีซีอาร์ ค่ามัธยฐานของความเข้มของ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส แบคทีรอยดีส์ ฟอร์ซัยธัส และทริโปเนมา เดนติโคลา มีความสัมพันธ์กับร่องลึกปริทันต์ที่ลึกอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรงที่ p = 0.001, 0.001 และ 0.001 ตามลำดับ และในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังที่ p = 0.001, 0.007 และ 0.017 ตามลำดับ ในขณะที่ค่ามัธยฐานของความเข้มของพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย และ แอคทิโนบาซิลลัส แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ มีความสัมพันธ์กับร่องปริทันต์ที่ลึกอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรงที่ p = 0.001 และ 0.017 ตามลำดับ ค่ามัธยฐานของความเข้มของพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย และ แอคทิโนบาซิลลัส แอคทิโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ไม่มีความสัมพันธ์กับร่องปริทันต์ที่ลึกอย่างมีนัยสำคัญ ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรังที่ p = 0.114 และ 0.887 ตามลำดับ ข้อมูลนี้แสดงแนะว่าปริมาณของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส แบคทีรอยดีส์ ฟอร์ซัยธัส และทริโปเนมา เดนติโคลา มีความสัมพันธ์กับการทำลายอวัยวะปริทันต์ในโรคปริทันต์อักเสบทั้งชนิดรุนแรงและเรื้อรังและสามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์ความรุนแรงและการลุกลามของโรคปริทันต์

* ภาควิชาทันตวิทยา-พยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
** ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ ม. เชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50200
*** นักศึกษาระดับประกาศนียบัตรบัณฑิต ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50200

โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน

Molecules involved with tooth eruption

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ

สำเนาการพิมพ์จากวิทยาสารทันตแพทยศาสตร์

ปีที่ ๕๒ ฉบับที่ ๖ พฤศจิกายน-ธันวาคม ๒๕๔๕

หน้า ๔๒๙-๔๓๘

Reprinted from the Journal of the Dental Association of Thailand

Volume 52 Number 6 November-December 2002

pp. 429-438

โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน*

*สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ***

บทคัดย่อ

การขึ้นของฟันเป็นขบวนการธรรมชาติที่อาศัยการละลายตัวกระดูกที่อยู่ล้อมรอบหน่อฟันเพื่อเปิดช่องทางให้ฟันที่กำลังขึ้น ดังนั้นเซลล์สลายกระดูกที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนซัยต์จากหลอดเลือดภายในถุงหุ้มหน่อฟันจึงมีความสำคัญต่อขบวนการนี้ หลาย ๆ การศึกษาแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโมเลกุลและปัจจัยที่ควบคุมการถอดรหัสยีนในการสร้างเซลล์สลายกระดูก การละลายกระดูก และการขึ้นของฟันในที่สุด บทความปริทัศน์นี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมผลของการศึกษาเหล่านี้และอธิบายถึงบทบาทของโมเลกุลต่อกลไกการขึ้นของฟันในภาพรวม ผลการศึกษาชี้ให้เห็นถึงบทบาทของ โคโลนีสติมูเลติ้งแฟคเตอร์-๑ โมโนซัยต์คีโมแอทแทรคแต้นท์โปรตีน-๑ คลอดจน ซี-ฟอส และ นิวเคลียร์แฟคเตอร์-แคัพป้าบี ในการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการขึ้นของฟัน นอกจากนี้การศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้แสดงให้เห็นถึงบทบาทของโมเลกุลอื่น ๆ เช่น พาราธัยรอยด์ฮอร์โมน-รีเลตเต็ดโปรตีน ออสติโอโปรเทเจริน เป็นต้น ในการขึ้นของฟัน ความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาเหล่านี้อาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในคลินิก และช่วยทำให้เข้าใจถึงชีววิทยาของกระดูกโดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการละลายกระดูกซึ่งเราสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคที่มีการทำลายกระดูก

บทนำ

วิทยาการความรู้ทางด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) ได้ส่งผลทำให้การศึกษาค้นคว้าวิจัยที่เกี่ยวกับวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้เจริญรุดหน้าไปอย่างรวดเร็ว รวมไปถึงการสร้างองค์ความรู้ใหม่ ๆ ทางทันตแพทยศาสตร์ ในบทความนี้จะขอรวบรวมข้อมูลและความรู้ใหม่ ๆ ที่เกี่ยวกับชีววิทยาของการขึ้นของฟันในช่วงประมาณ ๑๐ กว่าปีที่ผ่านมา การขึ้นของฟันเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเฉพาะที่และการเหนี่ยวนำให้เกิดการขึ้นของฟันเกี่ยวข้องกับสัญญาณที่มาจากโมเลกุลหลาย ๆ ชนิด ซึ่งถ่ายทอดกันไปมาระหว่างเซลล์ที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟัน (dental follicle) และที่อยู่ในสเตลเลต เรติคิวลั่ม (stellate reticulum) ทำไมถึงต้องเรียนรู้เกี่ยวกับกลไกและโมเลกุลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน เหตุผลคือเราอาจนำความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้ใน

* ทุนสนับสนุนจาก ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี พ.ศ. 2545
** ภาควิชาทันตวิทยา-พยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

การกระตุ้นฟันที่ฝังในกระดูกขากรรไกรให้ขึ้นมาในช่องปาก นอกจากนี้เราสามารถเรียนรู้เกี่ยวกับชีววิทยาของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกและการละลายตัวของกระดูกแบบบูรณาการ (integration) ในสิ่งมีชีวิตโดยตรงโดยอาศัยกลไกทางธรรมชาติที่มีอยู่แล้วคือการขึ้นของฟัน การขึ้นของฟันต้องอาศัยการละลายตัวของกระดูกบริเวณที่อยู่ตรงส่วนของตัวฟันเพื่อเปิดเป็นช่องทางให้ฟันโผล่ขึ้นมาสู่ช่องปากได้ในช่วงที่ฟันมีการสร้างเนื้อฟัน (dentin) ที่บริเวณรากฟัน

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยในช่วงแรกๆ แสดงถึงความสำคัญของถุงหุ้มหน่อฟันซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหลวมๆ ที่อยู่ล้อมรอบฟันต่อการขึ้นของฟัน ถ้าแยกเอาเนื้อเยื่อส่วนนี้ออกไป จะทำให้ฟันไม่ขึ้นมาในช่องปาก[1] ในขณะที่ถ้าเอาหน่อฟันออกแล้วใส่วัตถุอื่นๆ เข้าไปแทนที่หน่อฟัน วัตถุชิ้นนั้นก็ขึ้นมาในช่องปากได้[2] สำหรับในระดับเซลล์พบว่ามีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (monocytes) จำนวนมากเข้ามาที่ถุงหุ้มหน่อฟันในสุนัขอายุ 16 สัปดาห์[3] และในหนูอายุ 3 วัน[4] ซึ่งก็ตรงกับช่วงที่ฟันกรามน้อยซี่ที่ 3 ของสุนัขและฟันกรามของหนูกำลังขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ามีจำนวนเซลล์สลายกระดูก (osteoclasts) ในถุงหุ้มหน่อฟันมากที่สุดในช่วงเวลานี้ ดังนั้นการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์เข้ามาที่ถุงหุ้มหน่อฟันซึ่งตรงกับช่วงเวลาการขึ้นของฟันและช่วงที่มีการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์โมโนไซต์ทำให้เกิดการละลายตัวของกระดูกเกิดเป็นช่องทางให้ฟันขึ้นมาในช่องปาก ความสำคัญของการละลายตัวของกระดูกโดยเซลล์สลายกระดูกต่อการขึ้นของฟันยังพิสูจน์ได้จากหนูทดลองชนิดที่เป็นออสติโอพิโทรซิส (osteopetrosis) โดยพบว่าเกิดภาวะกระดูกแข็งกระด้าง (osteosclerosis) และเซลล์สลายกระดูกไม่ละลายกระดูกเหมือนปกติ จึงทำให้กระดูกทึบหนาแน่นกว่าปกติและทำให้ฟันของหนูชนิดนี้ไม่ขึ้นในช่องปาก[5]

โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน

แต่คำถามต่อไปคือว่ามีโมเลกุลอะไรที่มีส่วนช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ มีโมเลกุลหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟันทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม และมีการทดลองต่างๆ ทั้งในหลอดทดลอง *(in vitro)* และในสิ่งมีชีวิต *(in vivo)* แสดงถึงผลของโมเลกุลเหล่านี้ต่อการขึ้นของฟัน

โมเลกุลตัวแรกที่มีบทบาทโดยตรงต่อการขึ้นของฟัน คือ โคโลนีสติมูเลติ้งแฟคเตอร์-1 (colony stimulating factor-1; CSF-1)(รูปที่ 1) จากการทดลองเมื่อฉีด CSF-1 เข้าไปตรงบริเวณหน่อฟันตัดของหนูที่เป็นออสติโอพิโทรซิส (ไม่มีฟันขึ้นในช่องปาก) อายุ 1 วัน พบว่าฟันตัดของหนูสามารถขึ้นมาในช่องปากได้ และยังพบว่ามีการสร้างเซลล์สลายกระดูกเพิ่มขึ้น[6] นอกจากนี้เมื่อฉีด CSF-1 เข้าไปในหน่อฟันกรามซี่ที่หนึ่งของหนูปกติ ทำให้ฟันกรามซี่ที่หนึ่งของหนูขึ้นเร็วกว่าปกติ และยังพบเซลล์โมโนไซต์เคลื่อนตัวเข้ามาที่ถุงหุ้มหน่อฟันเป็นจำนวนมากและเซลล์สลายกระดูกเพิ่มจำนวนมากขึ้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า CSF-1 จำเป็นสำหรับการเปลี่ยนแปลงเซลล์โมโนไซต์ไปเป็นเซลล์สลายกระดูกซึ่งทำให้เกิดการละลายกระดูกและทำให้ฟันงอกขึ้นมาได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกของ CSF-1 ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอน่ำรหัส (mRNA) และระดับโปรตีนในเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) จากถุงหุ้มหน่อฟันที่ถูกเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง[7] เซลล์สร้างเส้นใยเป็นเซลล์หลักและพบจำนวนมากในถุงหุ้มหน่อฟัน นอกจากนี้ CSF-1 มีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เซลล์สร้างเส้นใยสร้าง CSF-1 เพิ่มขึ้นมาอีก[7] และอินเตอร์ลิวคิน-1 อัลฟ่า (interleukin-1α; IL-1α) กระตุ้นการสร้าง CSF-1 โดยเมื่อฉีด IL-1α เข้าไปในหนูทำให้เกิดการแสดงออกของ CSF-1 ที่มากขึ้นในเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟัน[8] CSF-1 กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนซีฟอส (c-fos) มากขึ้นโดยพบว่าการแสดงออกของ c-fos มีมากขึ้นในหนูที่ถูกฉีดด้วย CSF-1[9] c-fos เป็นปัจจัยที่ควบคุมการถอดรหัสยีน (transcription factor) ที่จำเป็นต่อการสร้างและการพัฒนาที่สมบูรณ์ของเซลล์สลายกระดูก [10] นอกจากนี้ Grigoriadis และคณะ [10] พบว่าหนูที่ไม่สร้าง c-fos ทำให้หนูเป็นออสติโอพิโทรซิสและฟันไม่ขึ้นมาในช่องปาก ถึงแม้จะมีการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนไซต์มาที่ถุงหุ้มหน่อฟันก็ตามแต่ไม่พบเซลล์สลายกระดูกเลย สรุปได้ว่า c-fos มีหน้าที่ในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเซลล์โมโนไซต์ให้กลายเป็นเซลล์สลายกระดูกที่สมบูรณ์และทำหน้าที่ได้ และการกระตุ้นการทำงานของ c-fos โดย CSF-1 ในถุงหุ้มหน่อฟันมีความสำคัญต่อการขึ้นของฟัน

โมเลกุลตัวที่สองคือโมโนไซต์คีโมแอทแทรคแตนท์โปรตีน-1 (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) (รูปที่ 1) ที่สร้างจากเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) จำนวนมากมายในถุงหุ้มหน่อฟัน นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟันสามารถสร้าง MCP-1[11] และหลั่ง MCP-1 ออกมาภายนอกเซลล์ [12] MCP-1 เหนี่ยว

นำให้มีการเคลื่อนที่ของเซลล์โมโนซัยต์ออกจากหลอดเลือดและเข้าไปอยู่ในถุงหุ้มหน่อฟัน MCP-1 เป็นเพ็ปไทด์เส้นเดี่ยวที่มีขนาดความยาวของกรดอะมิโน 148 ตัว ซึ่งประกอบด้วยซิกนัลโดเมน (signal domain) ที่จะต้องถูกตัดออกยาว 23 ตัว และส่วนเพ็ปไทด์ที่ทำงานได้ยาว 125 ตัว พบว่าโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟันตัวอื่นๆ อาทิ ทรานสฟอร์มมิ่งโกรว์ธแฟคเตอร์-เบต้า (Transforming growth factor-β; TGF-β) และ IL-1α ต่างกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ MCP-1 เพิ่มขึ้นในเซลล์สร้างเส้นใยที่พบในถุงหุ้มหน่อฟัน [13]

เมื่อเร็วๆ นี้มีการศึกษาในหนูทดลองที่ไม่สามารถสร้างโปรตีนที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับพาราธัยรอยด์ฮอร์โมน (parathyroid hormone; PTH) ที่มีชื่อว่าพาราธัยรอยด์ฮอร์โมน-รีเลตเต็ดโปรตีน (parathyroid hormone-related protein; PTHrP)[14] โดยพบว่าหนูชนิดนี้ตายตั้งแต่เกิดจากการที่เซลล์ของกระดูกอ่อนเจริญไปเป็นเซลล์ของกระดูกเร็วเกินไป ซึ่งจะทำให้มีการสร้างกระดูกอย่างรวดเร็วมากเกินไปในบริเวณที่ควรจะเป็นกระดูกอ่อน ในทางกลับกันหนูที่สร้างโปรตีนตัวนี้มากเกินไปทำให้เกิดความล่าช้าในการสร้างกระดูก ในการศึกษานี้[14] ยังได้ทดลองดัดแปลงยีนของหนูให้มีการสร้าง PTHrP เฉพาะบริเวณที่เป็นกระดูกอ่อนเท่านั้น ทำให้หนูที่ไม่สร้างโปรตีนชนิดนี้ตัวเล็กว่าข้างต้นมีชีวิตอยู่รอดได้อีกประมาณ 6 เดือนหลังจากคลอด แต่ก็ยังพบความผิดปกติของพัฒนาการ อาทิ หนูมีขนาดเล็กกว่าปกติ และที่สำคัญสำหรับบทความนี้คือฟันของหนูชนิดนี้ไม่ขึ้นมาในช่องปาก ในการศึกษาเดียวกัน[14] เมื่อได้มีการดัดแปลงยีนของหนูเพิ่มขึ้นอีกโดยทำให้มีการสร้าง PTHrP ในเนื้อเยื่อบุผิวโดยใช้การดัดแปลงยีนของหนูและเพิ่มส่วนบริเวณโปรโมเตอร์ (promoter) ของยีนเคอราติน 14 (keratin 14) ซึ่งแสดงออกในเนื้อเยื่อบุผิวเข้าไป ทำให้ฟันของหนูตัวนี้สามารถขึ้นมาในช่องปากได้และยังช่วยแก้ไขความผิดปกติที่เกิดขึ้นในขบวนการละลายกระดูก ผลจากการทดลองนี้พบว่าตัวรับสัญญาณ (receptor) ของ PTHrP แสดงออกที่บริเวณเซลล์มีเซ็นคายม์ (mesenchyme) ที่อยู่บริเวณถุงหุ้มหน่อฟันและบริเวณกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) (รูปที่ 2A) ในขณะที่ PTHrP แสดงออกในเซลล์ที่อยู่ในชั้นสเตลเลต เรติคิวลัมที่พัฒนามาจากชั้นเยื่อบุผิวในช่องปากและอยู่ระหว่างอินเนอร์อีนาเมลเอปิธีเลียม (inner enamel epithelium) และเอาเตอร์อีนาเมลเอปิธีเลียม (outer enamel epithelium) (รูปที่ 2B) สรุปได้ว่า PTHrP ที่สร้างจากชั้นสเตลเลต เรติคิวลัมมีความสำคัญต่อการขึ้นของฟันโดยไปกระตุ้นตัวรับสัญญาณของเซลล์มีเซ็นคายม์ที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟันให้สร้าง CSF-1 และ MCP-1[15] หรืออาจกระตุ้นให้มีการสร้างปัจจัยที่กระตุ้นการเกิดเซลล์สลายกระดูกให้มากขึ้นที่เรียกว่าออสติโอคลาสท์ ดิฟเฟอเรนทิเอชั่นแฟคเตอร์ (osteoclast differentiation factor; ODF) และยับยั้งปัจจัยที่ยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่เรียกว่า ออสติคลาสโตเจเนซิส อินฮิบิตอรี แฟคเตอร์ (osteoclastogenesis inhibitory factor; OIF) หรือ ออสติโอโปรเทเจริน (osteoprotegerin; OPG) (รูปที่ 1) โดยพบว่าการทดลองในหลอดทดลอง PTHrP ที่สร้างจากชั้นสเตลเลต เรติคิวลัมกระตุ้นการแสดงออกของอาร์เอ็นเอน่ารหัสของ ODF ในขณะที่ยับยั้งการแสดงออกของ OPG ในเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากถุงหุ้มหน่อฟัน[16] ผลสรุปจากการสร้างปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดกระตุ้นการเปลี่ยนสภาพของเซลล์โมโนซัยต์ที่มาจากเส้นเลือดให้เป็นเซลล์สลายกระดูก และนำไปสู่การละลายกระดูกที่อยู่เหนือและหุ้มฟันไว้เพื่อเปิดทางให้ฟันขึ้น

ODF หรือเรียกว่า ออสติโอโปรเทเจริน-ไลแกนด์ (Osteoprotegerin-ligand; OPG-L) หรือ รีเซ็พเตอร์แอคติเวเตอร์อ็อฟนิวเคลียร์แฟคเตอร์แคัพป้าบี-ไลแกนด์ (receptor activator of nuclear factor kappa B-ligand; RANK-L) เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์สลายกระดูกที่สมบูรณ์ และจัดอยู่ในครอบครัวเดียวกันกับทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา (tumor necrosis factor-α; TNF-α) ในสภาวะปกติ ODF สร้างมาจากเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก (bone marrow stromal cell) และเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และอยู่บนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) (รูปที่ 3) โดยที่ ODF จับกับตัวรับสัญญาณที่มีชื่อว่า รีเซ็พเตอร์แอคติเวเตอร์อ็อฟนิวเคลียร์แฟคเตอร์แคัพป้าบี (receptor activator of nuclear factor kappa B; RANK) บนเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก (osteoclast precursor cell) ในลักษณะที่เป็นการถ่ายทอดสัญญาณระหว่างเซลล์โดยตรง (direct cell-to-cell signaling) เพื่อกระตุ้นให้พัฒนาเป็นเซลล์สลายกระดูก แต่ในสภาวะที่เกิดการอักเสบนอกจากเซลล์สร้างกระดูกจะสร้าง ODF แล้ว เม็ดเลือดขาวที-ลิมโฟซัยต์ (T-lymphocyte) สามารถสร้าง ODF ได้ซึ่งพบ ODF ได้ทั้งบนเยื่อบุผิวเซลล์ที-ลิมโฟซัยต์หรือถูกปลดปล่อยออกมา [17] (รูปที่ 3) ดังนั้นในภาวะที่เกิดการอักเสบที-ลิมโฟซัยต์สามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกโดยผ่านการสร้าง ODF ซึ่งจะจับกับ

RANK บนเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูกเพื่อกระตุ้นให้พัฒนาเป็นเซลล์สลายกระดูก นอกจากที่ ODF กระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกแล้ว ซัยโตคายน์ (cytokine) ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 (interleukin-1; IL-1), TNF-α และพรอสตาแกลนดินอีทู (prostaglandin E_2; PGE_2) สามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก (รูปที่ 3)

ออสติโอโปรเทเจริน (osteoprotegerin; OPG) เป็นกลัยโคโปรตีน (glycoprotein) ที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูกและเซลล์สร้างกระดูกในสภาวะปกติ (รูปที่ 3) ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณตัวหลอก (decoy receptor) ที่สามารถจับกับ ODF ทำให้ไม่เกิดสัญญาณกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูก ดังนั้น OPG จึงทำหน้าที่ตรงกันข้ามกับ ODF คือเป็นตัวยับยั้งการเจริญพัฒนาสมบูรณ์ของเซลล์สลายกระดูก (รูปที่ 1) เพื่อควบคุมระดับการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการละลายกระดูกในสภาวะปกติ การทดลองเมื่อเร็วๆ นี้พบว่ามีการแสดงออกของ OPG ในเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟัน แต่การแสดงออกจะลดลงอย่างมากในช่วงเวลาที่มีการสร้างเซลล์สลายกระดูกเพื่อทำหน้าที่ละลายกระดูกและเป็นทางขึ้นของฟัน[14] ดังนั้นการที่การแสดงออกของ OPG ลดลงจะทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกมากขึ้นซึ่งก็ตรงกับช่วงเวลาที่พบเซลล์สลายกระดูกจำนวนมากในถุงหุ้มหน่อฟันในช่วงเวลาที่มีการทำลายกระดูกเหนือหน่อฟัน แต่ถึงอย่างไรก็ตามในช่วงเวลาอื่นๆ นั้นจะมีการแสดงออกของ OPG ตามปกติ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการละลายตัวของกระดูกและการทำลายอวัยวะปริทันต์ (periodontium)[19]

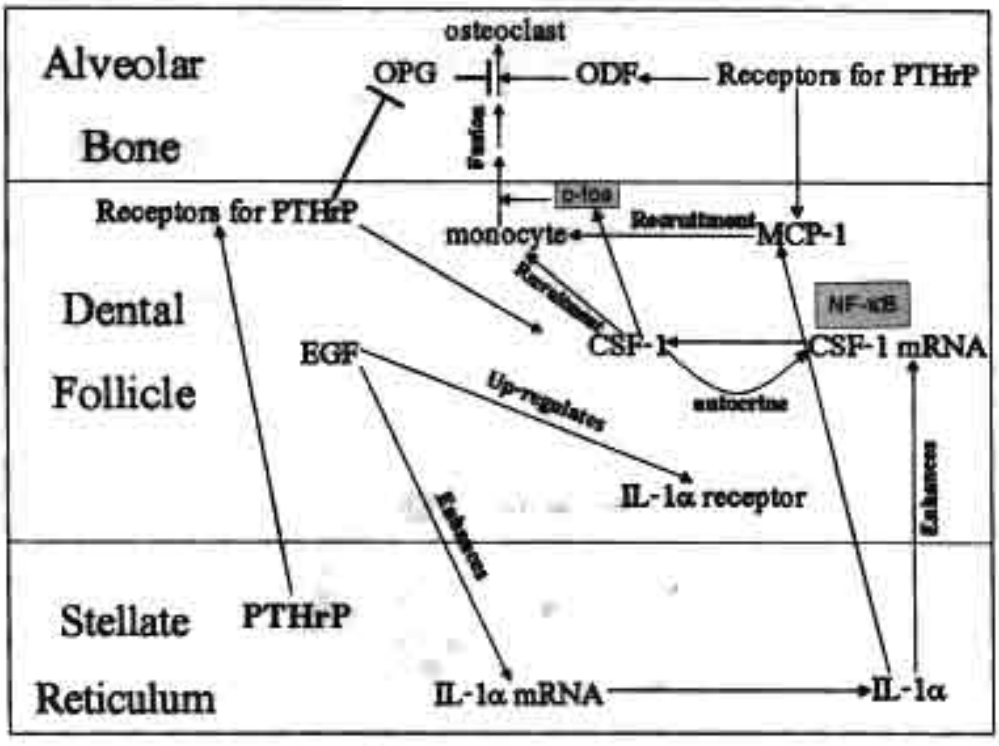
จากที่กล่าวข้างต้นถึงบทบาทของ OPG ในการยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการทำลายกระดูก Teng และคณะ[20] ได้ทำการทดลองโดยใช้หนูเป็นโมเดลในการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์ โดยพบว่าเม็ดเลือดขาวที-ลิมโฟซัยต์มีการสร้าง ODF (หรือเรียกว่า OPG-L) มากขึ้นเมื่อหนูติดเชื้อแอคติโนบาซิลัส แอคติโนมัยซิเต็มโคมิแทนส์ (Actinobacillus actinomycetemcomitans) และทำให้เกิดขบวนการอักเสบที่อวัยวะปริทันต์และกระดูกของหนูถูกทำลายไปอย่างมากจากการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกโดย ODF แต่เมื่อฉีด OPG ตรงตำแหน่งที่มีการทำลายกระดูกให้หนูทดลองวันเว้นวันเป็นเวลา 8 อาทิตย์ ปรากฏว่าการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการทำลายกระดูกลดลงไปอย่างมาก (ประมาณ 75% เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้ถูกฉีด OPG) ผลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของ OPG ในการลดการทำลายกระดูกที่เกิดจากโรคปริทันต์ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่จะนำ OPG มาใช้รักษาโรคปริทันต์ในอนาคต

โมเลกุลตัวที่สามคือ IL-1α (รูปที่ 1) พบว่า IL-1α เหนี่ยวนำให้ CSF-1 แสดงออกมากขึ้น [7] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า IL-1α แสดงออกในชั้นสเตลเลต เรติคิวลัม[21] ดังนั้น IL-1α ที่ถูกหลั่งออกมาอาจจะเคลื่อนเข้าไปกระตุ้นให้เซลล์สร้างเส้นใยในถุงหุ้มหน่อฟันสร้าง CSF-1[6] จากการทดลองเมื่อเร็วๆ นี้พบว่าหนูที่ไม่สร้างตัวรับสัญญาณต่อ IL-1α ฟันกรามซี่แรกของหนูตัวนั้นขึ้นช้าไป 2 วัน และฟันตัดขึ้นช้าไป 1 วันเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ [22] แต่ถึงอย่างไรก็ตามฟันของหนูก็ยังขึ้นตามปกติซึ่งต่างจากหนูที่เป็นออสติโอพีโทรซิสที่ฟันไม่ขึ้นเลย สรุปได้ว่าโดยปกติแล้ว IL-1α มีส่วนช่วยในการขึ้นของฟันแต่อย่างไรก็ตามฟันก็ยังขึ้นมาในช่องปากถึงแม้ไม่มีการสร้าง IL-1α หรือตัวรับสัญญาณ ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่ามีโมเลกุลอื่นๆ ที่มีหน้าที่คล้ายๆ กันทำหน้าที่ซ้ำซ้อนกันอยู่ (redundancy) ถึงแม้ว่าจะขาดโมเลกุลตัวหนึ่งไปแต่อีกตัวสามารถทำงานทดแทนได้ จากการทดลองของ Que และคณะ[23] พบว่า IL-1α ที่สร้างมาจากเซลล์ในชั้นสเตลเลต เรติคิวลัมมีผลต่อการกระตุ้นการสร้างนิวเคลียร์แฟคเตอร์-แคัพป้าบี (nuclear factor-kappa B; NF-KB) ในเซลล์สร้างเส้นใยจากถุงหุ้มหน่อฟัน NF-KB เป็นปัจจัยที่ควบคุมการถอดรหัสยีนที่มีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของหลายๆ ยีน และยีนตัวที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟันและน่าจะถูกควบคุมโดย NF-KB คือ MCP-1 เป็นที่ทราบกันดีว่าการแสดงออกของ MCP-1 ถูกควบคุมโดย NF-KB ในเซลล์ชนิดอื่น [24] แต่อย่างไรก็ตามผลของ NF-KB ต่อ MCP-1 ควรจะได้รับการศึกษาต่อไป ยังมีรายงานการศึกษาอีก 2 ฉบับที่ยืนยันถึงความสำคัญของ NF-KB ต่อการขึ้นของฟัน โดยพบว่าหนูที่ไม่มีการสร้าง NF-KB ตัวที่ 1 หรือ 2 จะทำให้เกิดความบกพร่องในการเจริญพัฒนาของเซลล์สลายกระดูกจนทำให้ฟันของหนูไม่ขึ้นในช่องปาก [25,26]

โมเลกุลตัวที่สี่คือ เอพิเดอร์เมิล โกรว์ธแฟคเตอร์ (Epidermal growth factor; EGF) (รูปที่ 1) EGF สามารถกระตุ้นการขึ้นของฟันหน้าคัดก่อนกำหนด นอกจากนี้หลังจากฉีด EGF เข้าไปในหนูพบว่า EGF สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-1α ในเซลล์เยื่อบุผิวในชั้นสเตลเลต เรติคิวลัมและมีการกระตุ้นการสร้างตัวรับ

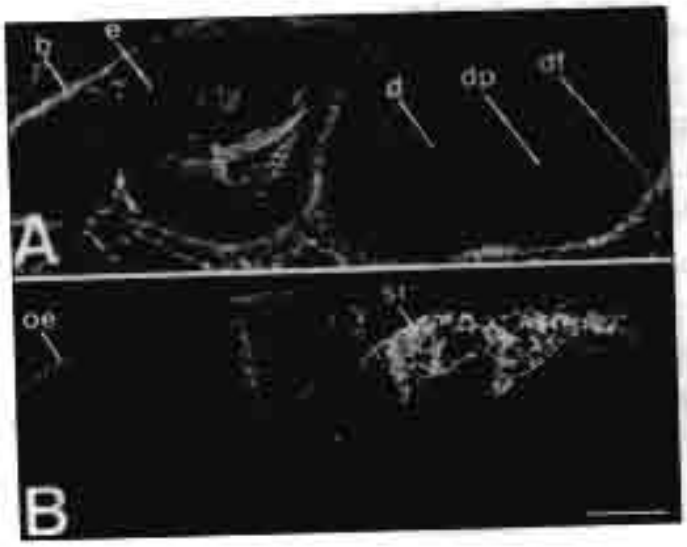
สัญญาณต่อ IL-1α มากขึ้นในเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟัน[21] แต่ EGF ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ CSF-1 ได้โดยตรง ดังนั้น EGF กระตุ้นการขึ้นของฟันโดยมีผลทางอ้อมในการกระตุ้นการสร้าง IL-1α ที่เซลล์ในชั้นสเตลเลตเรติคิวลัมหรือกระตุ้นการสร้างตัวรับสัญญาณของ IL-1α ให้เพิ่มขึ้นในเซลล์สร้างเส้นใยที่อยู่ในถุงหุ้มหน่อฟัน

นอกจากโมเลกุลที่ได้กล่าวมาข้างต้น ยังมีสารเคมีบางชนิดที่มีผลต่อการขึ้นของฟัน ได้แก่ ยาในกลุ่มบิสฟอสฟอเนต (bisphosphonate) สามารถยับยั้งการทำลายกระดูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไปยับยั้งไม่ให้เซลล์สลายกระดูกพัฒนาอย่างสมบูรณ์[27] หรือมีรายงานว่ายาในกลุ่มนี้ช่วยส่งเสริมให้มีการตาย (apoptosis) ของเซลล์สลายกระดูก[28] มีการนำยาในกลุ่มนี้มาใช้ในการรักษาโรคที่มีการทำลายกระดูกเช่นโรคมัลติเพิ้ล มัยอีโลม่า (multiple myeloma) ชนิดที่มีการทำลายกระดูก[29] ไฟบรัส ดิสเพลเซีย (fibrous dysplasia)[30] และนอกจากนี้มีแนวคิดที่จะนำยาในกลุ่มนี้มารักษาโรคกระดูกพรุน (Osteoporosis) สำหรับผลของยาในกลุ่มนี้ต่อการขึ้นของฟัน พบว่ายาชื่อพามิโดรเนท (Pamidronate) ทำให้การขึ้นของฟันตัดและฟันกรามของหนูทดลองล่าช้าไป ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ในการละลายกระดูกของเซลล์สลายกระดูกลดลง[31]



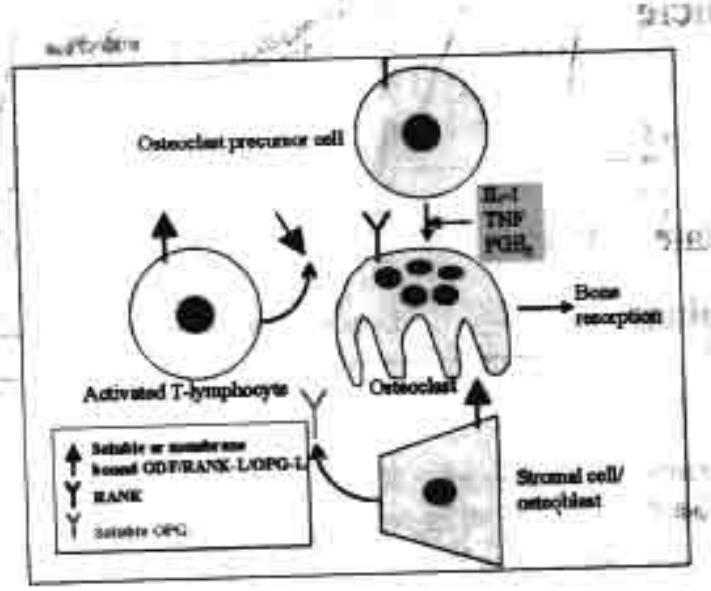
รูปที่ 1 แผนภาพแสดงสมมติฐานของการถ่ายทอดสัญญาณระหว่างโมเลกุลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน → หมายถึง การกระตุ้น ⊣ หมายถึงการยับยั้ง ▬ เน้นถึงปัจจัยที่ควบคุมการถอดรหัสอันได้แก่ c-Fos และ NF-κB (ดัดแปลงจาก Wise and Lin[32])

Fig. 1 A hypothetical diagram shows signaling between different molecules involved with tooth eruption. → means induction; ⊣ means inhibition; ▬ emphasizes c-Fos and NF-κB transcription factors. This diagram is modified from Wise and Lin [32]. CSF-1 = colony stimulating factor-1, EGF = epidermal growth factor, IL-1α = interleukin-1α, MCP-1 = monocyte chemoattractant protein-1, NF-κB = nuclear factor-kappa B, ODF = osteoclast differentiation factor, OPG = osteoprotegerin, PTHrP = parathyroid hormone-related protein.



รูปที่ 2 การแสดงออกของอาร์เอ็นเอผ่าหัสของตัวรับสัญญาณสำหรับพาราธัยรอยด์ฮอร์โมน-รีเลตเต็ดโปรตีน (A) และพาราธัยรอยด์ฮอร์โมน-รีเลตเต็ดโปรตีน (B) ในกระดูกขากรรไกรล่างบริเวณฟันกรามของหนูโดยใช้เทคนิค อินไซตู ยับบริดไดเซชั่น หมายถึงการแสดงออกของตัวรับสัญญาณที่กระดูก (b) และที่อุ่งหุ้มรากฟัน (df) ในขณะที่พบการแสดงออกของพาราธัยรอยด์ฮอร์โมน-รีเลตเต็ดโปรตีนที่เซลล์เยื่อบุผิวอีนาเมลด้านนอก (oe) และที่สตลเลท เรติคิวลัม (sr). (e) หมายถึงเคลือบฟัน (d) หมายถึงเนื้อฟัน และ (dp) หมายถึงปุ่มเนื้อกำเนิดฟัน เส้นแสดงขนาดใน (B) แสดงความยาว 0.12 มม. ภาพนี้นำมาจาก Philbrick และคณะ [14] โดยได้รับการอนุญาตตีพิมพ์จากสถาบันวิทยาศาสตร์แห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา

Fig. 2 *mRNA expression of receptors for PTHrP (A) and PTHrP (B) in the molar area of mouse mandible by using in situ hybridization. Expression of receptors is found at bone (b) and dental follicle (df), while expression of PTHrP is found at the outer enamel epithelium (oe) and the stellate reticulum (sr). (e) represents enamel; (d) represents dentin; and (dp) represents dental papilla. The scale bar in (B) represents 0.12 mm. This figure is reproduced with permission from Philbrick et al., 1996 [14] (Copyright 1996 National Academy of Sciences, U.S.A.).*



รูปที่ 3 การควบคุมการสร้างเซลล์สลายกระดูก (ดัดแปลงจาก Lorenzo [17])

Fig. 3 *Regulation of osteoclast formation. This figure is modified from Lorenzo [17]. IL-1 = interleukin-1, ODF/RANK-L/OPG-L = osteoclast differentiation factor/receptor activator of nuclear factor kappa B-ligand/osteoprotegerin-ligand, OPG = osteoprotegerin, PGE_2 = prostaglandinE_2, RANK = receptor activator of nuclear factor kappa B, TNF = tumor necrosis factor.*

บทสรุป

บทความปริทัศน์นี้ได้กล่าวถึงโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน ซึ่งผลการทดลองที่ได้มาจากการทดลองในสัตว์ทดลองเช่น หนู สุนัข ซึ่งมีชุดฟัน (dentition) ที่แตกต่างจากมนุษย์ ถึงแม้ว่าจะมีการเลี้ยงเซลล์มนุษย์เพื่อทำการทดลอง แต่สภาวะที่ทำการทดลองในหลอดทดลองนั้นมีความแตกต่างอย่างมากจากสภาวะที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อจริงซึ่งมีความสลับซับซ้อนมากกว่า ดังนั้นการที่จะสรุปผลของโมเลกุลที่ถูกกล่าวถึงในบทความนี้ต่อการขึ้นของฟันน้ำนมและฟันแท้ในมนุษย์จำเป็นที่จะต้องพิสูจน์และทำการทดลองวิจัยเพิ่มเติม นอกจากนี้อาจจะมีโมเลกุลอื่นๆ อีกที่ไม่ได้ถูกกล่าวไว้ในบทความนี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการขึ้นของฟัน เนื่องจากความรู้ที่ได้จากการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยเฉพาะที่ทำการตัดต่อดัดแปลงยีน (transgene) หรือทำให้ยีนนั้นไม่มีการแสดงออก (gene knockout) ทำให้เราสามารถที่จะเลือกศึกษาโมเลกุลเฉพาะบางตัวเท่านั้นที่จะมีผลต่อการละลายกระดูกและการขึ้นของฟันในมนุษย์ บทความนี้ไม่ได้กล่าวถึงปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลร่วมต่อการขึ้นของฟัน เช่น การละลายตัวของรากฟันน้ำนม แรงดันที่ทำให้ฟันขึ้นสู่ในช่องปาก หรือการสร้างรากฟันในช่วงที่ฟันกำลังขึ้น แต่บทความนี้ได้รวบรวมเนื้อหาเกี่ยวกับการละลายกระดูกที่อยู่เหนือตัวฟันซึ่งเป็นกลไกอันหนึ่งที่จำเป็นต่อการขึ้นของฟันอย่างละเอียด ดังนั้นจึงขอสรุปเนื้อหาทั้งหมดไว้ดังนี้

การละลายกระดูกจำเป็นต้องอาศัยเซลล์สลายกระดูกที่มาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนซัยต์ในหลอดเลือดที่พบเป็นจำนวนมากในถุงหุ้มหน่อฟัน CSF-1 และ MCP-1 ที่สร้างจากเซลล์สร้างเส้นใยในถุงหุ้มหน่อฟันเป็นตัวชักนำให้เซลล์โมโนซัยต์เคลื่อนที่ออกมาจากหลอดเลือดและเข้ามาในถุงหุ้มหน่อฟัน หลังจากนั้น CSF-1 จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเซลล์โมโนซัยต์ให้เป็นเซลล์สลายกระดูกโดยมีการกระตุ้นผ่านปัจจัยที่ควบคุมการถอดรหัสยีนได้แก่ c-Fos และ NF-KB นอกจากที่ CSF-1 จะมีบทบาทในการสร้างเซลล์สลายกระดูกนั้น ยังมีโมเลกุลอื่นๆ ที่มีส่วนร่วมในการควบคุมการสร้างเซลล์สลายกระดูก อาทิ PTHrP ที่สร้างจากเซลล์เยื่อบุผิวในชั้นสเตลเลท เรติคิวลัม สามารถกระตุ้นการสร้าง ODF และยับยั้ง OPG ในเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สร้างกระดูก และเซลล์มีเซ็นคายมีในถุงหุ้มหน่อฟัน ODF มีผลในการกระตุ้นการสร้างเซลล์สลายกระดูกในขณะที่ OPG มีผลในการยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูก ดังนั้นบทความนี้จึงกล่าวถึงความสำคัญของปฏิกิริยาระหว่างเซลล์สองชนิดต่อการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการขึ้นของฟันในที่สุด ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผิวในชั้นสเตลเลท เรติคิวลัม ซึ่งจะสร้าง PTHrP ทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้าง ODF และยับยั้งการสร้าง OPG ที่สร้างมาจากเซลล์มีเซ็นคายมีในถุงหุ้มหน่อฟัน นอกจากนี้ IL-1α ที่สร้างจากเซลล์เยื่อบุผิวในชั้นสเตลเลท เรติคิวลัม สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ CSF-1 (รูปที่ 1)

สำหรับทันตแพทย์ทั่วๆ ไป ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับการละลายกระดูกอาจถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางทันตกรรมไม่เฉพาะแต่เรื่องการขึ้นของฟัน แต่ยังเกี่ยวข้องกับโรคในช่องปากที่เกี่ยวข้องกับการละลายกระดูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคปริทันต์ จากที่ได้กล่าวถึงการทดลองของ Teng และคณะ [30] พบว่า OPG ช่วยทำให้การละลายกระดูกอันเนื่องมาจากขบวนการอักเสบในโรคปริทันต์ในหนูลดลง แต่ถึงอย่างไรก็ตามในการทดลองนี้จำเป็นที่จะต้องฉีด OPG ให้หนูบ่อยครั้ง เนื่องจาก OPG เป็นสิ่งแปลกปลอมและถูกกำจัดออกจากร่างกาย ดังนั้นผู้เขียนมีความคิดที่จะใช้วิทยาการทางด้านอณูชีววิทยาในการปลูกถ่ายยีน OPG เข้าไปในเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูกโดยวิธีที่เรียกว่า ทรานสเฟคชั่น (transfection) โดยใช้ไวรัสเป็นพาหะ (vector) นำยีนเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์อย่างถาวร เซลล์ต้นกำเนิดนี้นำมาจากสัตว์ตัวเดียวกันกับที่จะถูกปลูกถ่ายยีน หลังจากนั้นจึงนำเซลล์นี้ใส่เข้าไปในอวัยวะปริทันต์โดยอาจใช้วัสดุต่างๆ ที่ใช้ในการบูรณะอวัยวะปริทันต์ในการนำเซลล์เข้าไปใส่ในเนื้อเยื่อ ข้อได้เปรียบของวิธีนี้คือ OPG จะถูกสร้างตลอดเวลาจากเซลล์ที่ใส่เพิ่มเข้าไปโดยไม่จำเป็นที่จะต้องฉีด OPG ให้บ่อยๆ ถ้าหากผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจโดยประเมินจากระดับการทำลายของกระดูกในระยะยาวและผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดขึ้น อาจจะขยายการทดลองนี้ออกไปสู่มนุษย์ จากที่กล่าวมาสรุปว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำ OPG มาใช้รักษาโรคปริทันต์เพื่อลดการสร้างเซลล์สลายกระดูกและการละลายกระดูกซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการสูญเสียฟัน โดยร่วมไปกับการรักษาโรคปริทันต์ตามปกติ

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อะนัม เอี่ยมอรุณ ในการให้ข้อเสนอแนะในการเขียนบทความ

เอกสารอ้างอิง

1. Cahill DR, Marks SC Jr. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. ***J Oral Pathol*** 1980;9:189-200.
2. Marks SC Jr, Cahill DR. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. ***Arch Oral Biol*** 1984;29:311-22.
3. Wise GE, Marks SC Jr, Cahill DR. Ultrastructural features of the dental follicle associated with formation of the tooth eruption pathway in the dog. ***J Oral Pathol*** 1985;14:15-26.
4. Wise GE, Fan W. Changes in the tartrate-resistant acid phosphatase cell population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. ***J Dent Res*** 1989;68:150-6.
5. Marks SC Jr. Tooth eruption and bone resorption: experimental investigation of the *ia* (osteopetrotic) rat as a model for studying their relationships. ***J Oral Pathol*** 1976;5:149-63.
6. Iizuka T, Cielinski M, Aukerman SL, Marks SC Jr. The effects of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) on tooth eruption in the toothless (osteopetrotic) rat illustrate the critical periods for bone resorption during tooth eruption. ***Arch Oral Biol*** 1992;37:629-36.
7. Wise GE, Lin F. Regulation and localization of colony-stimulating factor-1 mRNA in cultured rat dental follicle cells. ***Arch Oral Biol*** 1994;39 621-7.
8. Wise GE. *In vivo* effect of interleukin-1α on colony-stimulating factor-1 gene expression in the dental follicle of the rat molar. ***Arch Oral Biol*** 1998;43:163-5.
9. Wise GE, Marks SC Jr, Zhao L. Effect of CSF-1 on *in vivo* expression of c-fos in the dental follicle during tooth eruption. ***Eur J Oral Sci*** 1998; 106 (suppl 1): 397-400.
10. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, et al. C-fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. ***Science*** 1994;266:443-8.
11. Que BG, Wise GE. Colony-stimulating factor-1 and monocyte chemotactic protein-1 chemotaxis for monocytes in the rat dental follicle. ***Arch Oral Biol*** 1997;42:855-60.
12. Wise GE, Que BG, Huang H. Synthesis and secretion of MCP-1 by dental follicle cells- implications for tooth eruption. ***J Dent Res*** 1999;78:1677-81.
13. Que BG, Wise GE. Tooth eruption molecules enhance MCP-1 gene expression in the dental follicle of the rat. ***Dev Dynam*** 1998;212:346-51.
14. Philbrick WM, Dreyer BE, Nakchbandi IA, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 1998;95:11846-51.
15. Wise GE, Que BG, Huang H, Lumpkin SJ. Enhancement of gene expression in rat dental follicle cells by parathyroid hormone-related protein. ***Arch Oral Biol*** 2000;45:903-9.
16. Nakchbandi IA, Weir EE, Insogna KL, Philbrick WM, Broadus AE. Parathyroid hormone-related protein induces spontaneous osteoclast formation via a paracrine cascade. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 2000;97:7296-300.
17. Lorenzo J. Interactions between immune and bone cells: new insights with many remaining questions. ***J Clin Invest*** 2000;106:749-52.
18. Wise GE, Lumpkin SJ, Huang H, Zhang Q. Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption. ***J Dent Res*** 2000;79:1937-42.
19. Wise GE, Yao S, Zhang Q, Ren Y. Inhibition of osteoclastogenesis by the secretion of osteoprotegerin *in vitro* by rat dental follicle cells and its implication for tooth eruption. ***Arch Oral Biol*** 2002;47:247-54.
20. Teng Y-TA, Nguyen H, Gao X, Kong Y-Y, Gorczynski RM, Singh B, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. ***J Clin Invest*** 2000;106:R59-R67.
21. Wise GE, Lin F, Zhao L. Immunolocalization of interleukin-

1α in rat mandibular molars and its enhancement after *in vivo* injection of epidermal growth factor. ***Cell Tissue Res*** 1995;280:21-6.

22. Huang H, Wise GE. Delay of tooth eruption in null mice devoid of the type I IL-1R gene. ***Eur J Oral Sci*** 2000;108:297-302.
23. Que BG, Lumpkin SJ, Wise GE. Implications for tooth eruption of the effect of interleukin-1α on nuclear factor-κB gene expression in the rat dental follicle. ***Arch Oral Biol*** 1999;44:961-7.
24. Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert CA. Activation of nuclear factor-κB correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. ***Kidney Int*** 1995;48:1263-71.
25. Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R. Osteopetrosis in mice lacking NF-κB1 and NF-κB2. ***Nature Med*** 1997;3:1285-89.
26. Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, et al. Requirement for NF-κB in osteoclast and B-cell development. ***Genes Dev*** 1997;11:3482-96.
27. van beek E, Lowik C, van der Pluijm G, Papapoulos S. The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants *in vitro*: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. ***J Bone Miner Res*** 1999;14:722-9
28. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. ***Periodontol 2000*** 2000; 24: 99-126.
29. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordoni R, George S. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. ***N Eng J Med*** 1996;334:488-93.
30. Weinstein RS. Long-term aminobisphosphonate treatment of fibrous dysplasia: spectacular increase in bone density. ***J Bone Miner Res*** 1997;12:1314-15.
31. Grier RL, Wise GE. Inhibition of tooth eruption in the rat by a Bisphosphonate. ***J Dent Res*** 1998;77:8-15.
32. Wise GE, Lin F. The molecular biology of initiation of tooth eruption. ***J Dent Res*** 1995;74:303-6.

Review Article

Molecules Involved with Tooth Eruption*

*Suttichai Krisanaprakornkit***

Abstract

Tooth eruption is a natural process that depends on bone resorption surrounding a tooth bud to create a pathway for an erupting tooth. Consequently, osteoclasts, derived from blood monocytes in blood vessels within dental follicle, are essential for this process. Numerous studies have shown the importance of molecules and transcription factors in osteoclast formation, bone resorption, and eventually tooth eruption. The goals of this review article are to gather the results from these studies and to explain the roles of these molecules in the mechanism of tooth eruption as a whole. The results have indicated the role of colony stimulating factor-1, monocyte chemoattractant protein-1, as well as c-Fos and nuclear factor-kappa B, in osteoclast formation and tooth eruption. Moreover, recent studies have demonstrated the role of other molecules, such as parathyroid hormone-related protein, osteoprotegerin, etc., in tooth eruption. The knowledge gained from these studies may be applied for clinical uses and help us understand bone biology, particularly osteoclast formation and bone resorption, in which we can apply for the treatment of bone-resorbing diseases.

Key words : bone resorption; c-Fos; CSF-1; MCP-1; NF-κB; ODF; OPG; osteoclast; PTHrP

* *Financial support by Post-Doctoral Grant, The Thailand Research Fund, 2002*

** *Department of Odontology-Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200*

เทคนิคทางอณูชีววิทยาสำหรับงานวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์

Techniques in Molecular Biology for Dental Research

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ

สำเนาการพิมพ์จากวิทยาสารทันตแพทยศาสตร์
ปีที่ ๕๓ ฉบับที่ ๒ มีนาคม-เมษายน ๒๕๔๖
หน้า ๑๓๑-๑๔๐
Reprinted from the Journal of the Dental Association of Thailand
Volume 53 Number 2 March-April 2003
pp. 131-140

เทคนิคทางอณูชีววิทยาสำหรับงานวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ*

บทคัดย่อ

หลักการที่สำคัญของวิชาอณูชีววิทยาคือขบวนการทรานสคริพชั่นและทรานสเลชั่น ทรานสคริพชั่นเป็นขบวนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอจากดีเอ็นเอ ในขณะที่ทรานสเลชั่นเป็นขบวนการสังเคราะห์โปรตีน ในปัจจุบันความรู้และเทคนิคต่างๆ ของอณูชีววิทยาได้กลายเป็นเครื่องมือที่เป็นประโยชน์สำหรับการทดลองวิทยาศาสตร์เพื่อก่อให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกในระดับโมเลกุลของการพัฒนาสร้างเซลล์และอวัยวะต่างๆ ตลอดจนพยาธิกำเนิดของโรคมากขึ้นเรื่อยๆ การทำวิจัยวิทยาศาสตร์ในสาขาทันตแพทยศาสตร์ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพต้องอาศัยเทคนิคพื้นฐานและขั้นสูงของอณูชีววิทยาเหล่านี้อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้เพื่อทำให้วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยสำเร็จลุล่วง ในบทความปริทัศน์ฉบับนี้ ได้แบ่งเทคนิคเหล่านี้ไปตามวัตถุประสงค์ของการใช้เทคนิค เช่น การศึกษาอาร์เอ็นนำรหัสหรือโปรตีน หรือการศึกษาในหลอดทดลองหรือในเนื้อเยื่อ มิความจำเป็นสำหรับบุคลากรในคณะทันตแพทยศาสตร์และทันตแพทย์ทั่วๆไปที่จะต้องเข้าใจหลักการพื้นฐานของเทคนิคเหล่านี้เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยของตนเอง

บทนำ

รากฐานของวิชาอณูชีววิทยา (molecular biology) มาจากพื้นฐานความรู้ที่ว่ายีนของมนุษย์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสังเคราะห์อาร์เอ็นเอเพื่อสร้างเป็นโปรตีน ขบวนการถอดรหัสดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอเรียกว่า ทรานสคริพชั่น (transcription) และจากอาร์เอ็นเอถอดรหัสเป็นโปรตีนเรียกว่า ทรานสเลชั่น (translation) เทคนิคต่างๆ ถูกสร้างและพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ขบวนการทั้งสองนี้ ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคต่างๆ ของอณูชีววิทยามาใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์การแสดงออกและหน้าที่ของโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ของร่างกายตลอดจนปัจจัยที่ควบคุมการสร้างโมเลกุลเหล่านี้ ซึ่งทำให้ทราบถึงบทบาทของโมเลกุลต่างๆ ต่อการสร้างและพัฒนาอวัยวะหรือต่อการเกิดโรคในช่องปาก ดังนั้นผู้เขียนจึงขอนำความรู้และประสบการณ์ที่ได้รับจากการทดลองในห้องปฏิบัติการมาเขียนบทความเรื่องนี้ เพื่อให้ผู้อ่านได้รับความรู้ที่เป็นประโยชน์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัย เนื่องจากผู้เขียนมีความจำกัดในด้านเนื้อที่ จึงไม่สามารถนำเสนอเทคนิคทางอณูชีววิทยาได้ทั้งหมด แต่จะขอเสนอเทคนิคพื้นฐานบางเทคนิคเท่านั้น ตลอดจนอธิบายหลักการของแต่ละเทคนิคพอสังเขป ถ้าผู้อ่านสนใจสามารถหาความรู้เพิ่มเติมได้จากหนังสือ ที่ถูกอ้างอิงไว้ท้ายบทความหรือหนังสืออื่นๆ ที่เกี่ยวกับอณูชีววิทยา

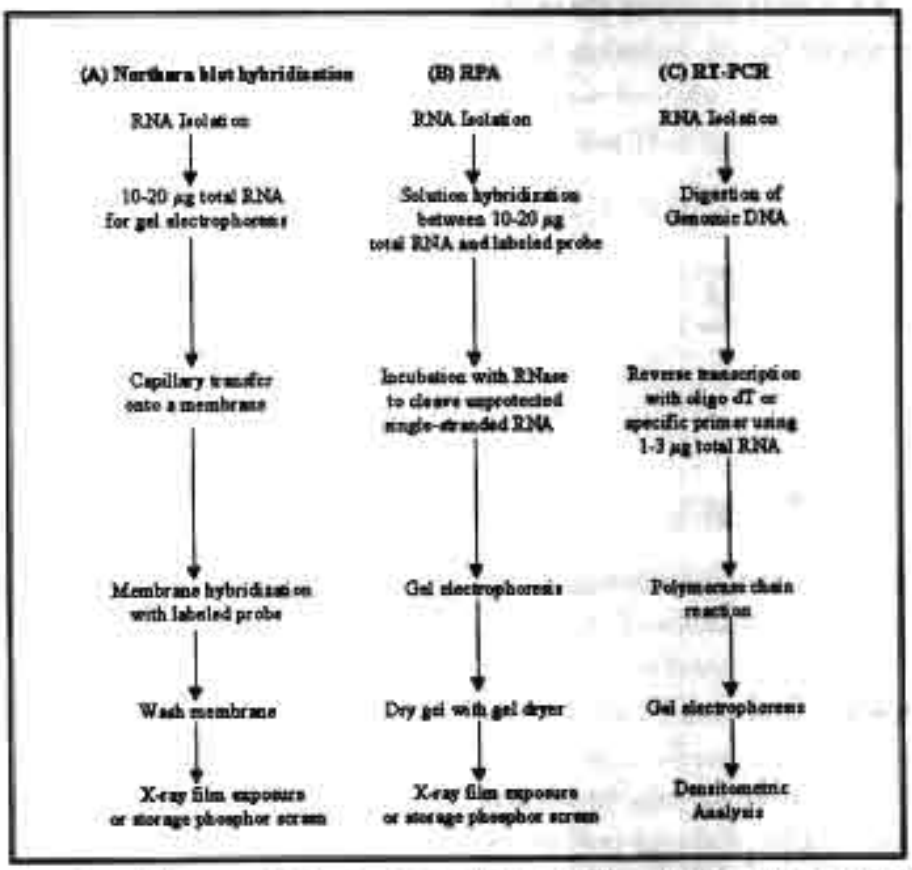
การวิเคราะห์การแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสในหลอด

* ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยปี พ.ศ. 2545

ทดลอง (*In vitro* analysis of mRNA expression)

เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย Northern blot hybridization ซึ่งถูกพัฒนามาจาก Southern blot hybridization (ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอ) หลักการย่อๆ (รูปที่ 1) คือการใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) ที่สกัดได้มาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ อาร์เอ็นเอซึ่งมีประจุลบจะวิ่งเข้าหาขั้วบวกและถูกแยกตามขนาดที่แตกต่างกันของอาร์เอ็นเอบนวุ้นอะกาโรส (agarose gel) ที่มีส่วนผสมของฟอร์มัลดีฮายด์ (formaldehyde) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ทำให้อาร์เอ็นเอสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ทำให้ไม่เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) และเป็นเส้นเดี่ยวเหมาะสำหรับการจับของโพรบ (probe) โดยที่อาร์เอ็นเอขนาดเล็กจะวิ่งได้เร็วและไกลกว่าอาร์เอ็นเอขนาดใหญ่ หลังจากนั้นจะมีการส่งถ่าย (transfer) อาร์เอ็นเอไปบนแมมเบรน (membrane) ซึ่งมักจะทำด้วยไนล่อน (nylon)โดยใช้แรงน้ำพาจากสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) หลังจากนั้นจะใช้โพรบที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและสามารถจับเป็นคู่สม (complementary) กับอาร์เอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งโพรบจะถูกติดฉลาก (label) ด้วยสารรังสี (radioisotopes) หรือ สารเคมีอื่นๆ เช่น ไบโอติน (biotin) ก่อนที่จะนำมาใช้จับ (hybridization) กับอาร์เอ็นเอบนแมมเบรน โดยส่วนใหญ่มักนิยมใช้อาร์เอ็นเอโพรบเพราะจะจับกับอาร์เอ็นเอได้ดีกว่าซีดีเอ็นเอโพรบ [cDNA (complementary DNA) probe] หลังจากนั้นใช้วิธีตรวจสอบที่เหมาะสม เช่น ใช้แผ่น storage phosphor screen หรือแผ่นฟิลม์เอ็กซเรย์ในการรับพลังงานรังสีจากสารรังสี เป็นต้น

ยังมีเทคนิคอื่นๆ ที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัส อาทิ Ribonuclease Protection Assay (RPA) ซึ่งมีหลักการคล้ายกับ Northern blot hybridization แต่แตกต่างตรงที่โพรบจะจับกับอาร์เอ็นเอในสารละลาย (solution hybridization) และต้องใช้เอ็นไซม์ไรโบนิวคลิเอส (ribonuclease, RNase) (รูปที่ 1) ในการตัดสายอาร์เอ็นเอเส้นเดี่ยว (unprotected single-stranded RNA) แต่จะไม่



รูปที่ 1 แผนภูมิเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างขั้นตอนของเทคนิค Northern blot hybridization (A), Ribonuclease Protection Assay (RPA) (B), and Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (C) ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสในหลอดทดลอง

Fig. 1 A diagram compares the differences between techniques used to analyze mRNA expression in vitro, including Northern blot hybridization (A), Ribonuclease Protection Assay (RPA) (B), and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (C).

สามารถตัดสายอาร์เอ็นเอเส้นคู่ (double strand) ซึ่งเกิดจากการจับกันของโพรบและบางส่วนของอาร์เอ็นนำรหัสที่สนใจซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกัน ดังนั้นขนาดของแถบ (band) อาร์เอ็นเอที่เห็นจากเทคนิค RPA จึงไม่ใช่ขนาดทั้งหมดของอาร์เอ็นเอนำรหัส ซึ่งจะต่างจากขนาดของแถบอาร์เอ็นเอที่เห็นจากเทคนิค Northern blot hybridization ที่เป็นขนาดจริงของอาร์เอ็นเอนำรหัส ข้อดีของ RPA คือมีความไวต่อการตรวจหาการแสดงออกของอาร์เอ็นเอมากกว่า Northern blot hybridization ถึง 10 เท่าเนื่องจากการจับกันของโพรบและอาร์เอ็นเอนำรหัสเกิดในสารละลายที่มีปริมาตรน้อยๆ เทคนิค RPA นี้จะมีประโยชน์ถ้าต้องการศึกษาอาร์เอ็นเอนำรหัสที่มีการแสดงออกในระดับต่ำๆ

เทคนิคอื่นๆ ที่ใช้ตรวจหาการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัส เช่น Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เทคนิคนี้มีความไวในการตรวจสูงมากกว่าสองเทคนิคข้างต้นโดยสามารถตรวจอาร์เอ็นเอนำรหัสในปริมาณอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ (1-3 µg. รูปที่ 1) และทำได้ง่ายกว่าสองเทคนิคข้างต้น แต่ไม่สามารถวัดระดับปริมาณการแสดงออกของอาร์เอ็นเอได้อย่างถูกต้อง หลักการของเทคนิคนี้ (รูปที่ 1) คือการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอนำรหัสไปเป็นซีดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์รีเวิร์ส ทรานสคริพเตส (Reverse Transcriptase)โดยใช้สายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) สั้นๆ ที่เรียกว่าไพรเมอร์ (primer) เฉพาะสำหรับยีนที่ต้องการศึกษา หรือใช้โอลิโกดีที (oligo dT) ซึ่งเป็นสายนิวคลีโอไทด์ยาวประมาณ 16-18 ตัวที่ประกอบด้วยเบสไธมีดีน (thymidine, T) อย่างเดียว ในการเป็นตัวนำสำหรับการเริ่มขบวนการทรานสคริพชั่นในทิศทางย้อนกลับ (reverse transcription) การใช้โอลิโกดีทีเกิดมาจากหลักการที่ว่าอาร์เอ็นนำรหัสทุกตัวของเซลล์ยูคาริโอต์ (eukaryotic cells) จะมีปลายทางด้านท้ายเป็นโพลีเอเทล (poly A tail) คือประกอบด้วยเบสอะดีนีน (adenine, A) เรียงต่อกันอยู่หลายตัว ซึ่งเป็นลักษณะที่พบเฉพาะสำหรับอาร์เอ็นเอนำรหัส ดังนั้นเมื่อโอลิโกดีทีเข้าไปในปฏิกิริยาก็จะจับกับโพลีเอเทลของอาร์เอ็นเอนำรหัสทุกชนิด จึงทำให้เกิดการสร้างซีดีเอ็นเอที่มีต้นแบบมาจากอาร์เอ็นเอนำรหัสทุกชนิดที่มีการแสดงออกในขณะนั้น หลังจากนั้นก็ใช้หลักการของ polymerase chain reaction (PCR) เข้ามาเพิ่มขยายจำนวนซีดีเอ็นเอโดยใช้เอ็นไซม์แท็คดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) จนกระทั่งสามารถตรวจวัดแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR (PCR product) บนวุ้นอะกาโรสด้วยการย้อมด้วยสีย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide) หรือไซเบอร์กรีน (SYBRGreen) และรังสีอัลตร้าไวโอเลต (ultraviolet) แต่ถึงอย่างไรก็ตาม RT-PCR เป็นเทคนิคที่หาการแสดงออกของยีนในระดับกึ่งเชิงปริมาณ (semi-quantitative) โดยการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Densitometer) ในขณะที่ Northern blot hybridization และ RPA เป็นการวัดระดับการแสดงออกของยีนอย่างถูกต้องมากกว่า รูปที่ 1 เปรียบเทียบความแตกต่างของหลักการของเทคนิคทั้งสามชนิดดังกล่าวข้างต้น

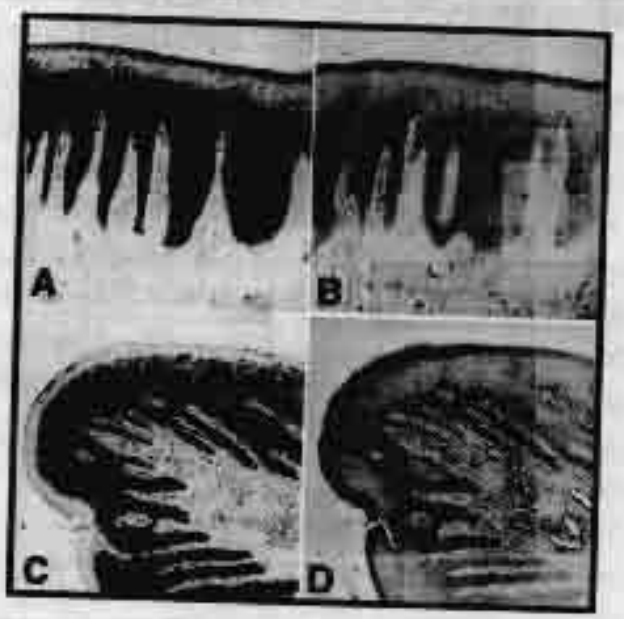
มีการพัฒนาเทคนิค RT-PCR เพื่อให้วัดระดับปริมาณของอาร์เอ็นเอได้ถูกต้องมากขึ้น โดยการเติมดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณแน่ชัดและมีลำดับเบสที่เหมือนกับซีดีเอ็นเอเข้าไปในตัวอย่างเพื่อเข้าไปแข่งกับซีดีเอ็นเอที่อยู่ในตัวอย่างในช่วงปฏิกิริยา PCR เรียกวิธีนี้ว่า Competitive RT-PCR ดังนั้นจึงทำให้รู้ปริมาณของซีดีเอ็นเอในตัวอย่างได้จากการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณ เมื่อเร็วๆ นี้มีการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ที่เรียกว่า Real time PCR และ Real time RT-PCR โดยมีหลักการคล้ายกับเทคนิค PCR และ RT-PCR ตามลำดับ แต่แตกต่างกันตรงที่สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ถูกต้องเนื่องจากสามารถติดตามผลของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมได้ในแต่ละรอบของการขยายสารพันธุกรรม [ซึ่งแตกต่างจากเทคนิคดั้งเดิมคือการวิเคราะห์ผลที่รอบสุดท้ายของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (end-point analysis) ซึ่งบางครั้งอาจจะขยายสารพันธุกรรมมากจนเกินไปจนทำให้ไม่สามารถวัดความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง] ข้อดีของการทราบปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มจำนวนขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR คือทำให้วิเคราะห์ปริมาณได้ในช่วงที่เริ่มมีการเพิ่มขยายสารอย่างรวดเร็วหรือเรียกว่าล็อคเฟส (log phase) ซึ่งทำให้การวัดปริมาณของสารพันธุกรรมได้ถูกต้อง

สามารถแบ่งเทคนิค Real-time PCR เป็นสองประเภทใหญ่ๆ คือประเภทแรกใช้สีไซเบอร์กรีน ในการจับดีเอ็นเอสายคู่อย่างไม่เฉพาะเจาะจง จึงทำให้ปริมาณของสารพันธุกรรมที่วัดได้จะเป็นจำนวนของสารพันธุกรรมทั้งหมดที่อยู่ในตัวอย่างไม่เฉพาะแต่สารพันธุกรรมที่สนใจ ประเภทสองคือการสร้างโพรบขึ้นมาจับกับสายดีเอ็นเอเฉพาะที่สนใจนอกเหนือไปจากโพรเมอร์ที่ต้องใส่ในปฏิกิริยาอยู่แล้ว โพรบถูกติดฉลากด้วยสารฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) (คือสารที่สามารถถูกกระตุ้นด้วยแสงและปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปแสงที่มีความยาวคลื่นต่างจากตอนที่ถูกกระตุ้น และสามารถวัดปริมาณแสงที่ถูกปลดปล่อยออกมาในช่วงความยาวคลื่นนั้นๆ) สามารถแบ่งเทคนิค

ประเภทสองออกเป็นอีกสองชนิดตามหลักการในการวิเคราะห์โพรบคือ ชนิดที่ใช้หลักการของ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) คือจะวัดปริมาณแสงที่ปลดปล่อยออกมาหลังจากที่มีการจับ (hybridization) ของโพรบกับสายดีเอ็นเอ โดยที่เมื่อแสงไปกระตุ้นฟลูออโรฟอร์ที่ติดอยู่กับโพรบตัวหนึ่งแล้วปล่อยพลังงานออกมาไปกระตุ้นฟลูออโรฟอร์ที่ติดอยู่กับโพรบอีกตัวหนึ่ง การถ่ายเทพลังงานระหว่างฟลูออโรฟอร์สองชนิดจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อฟลูออโรฟอร์ทั้งสองชนิดนี้อยู่ใกล้กันในช่วงที่เกิดการจับกันของโพรบกับสายดีเอ็นเอ และทำการวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent activity) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากฟลูออโรฟอร์ตัวที่สองซึ่งมีความยาวคลื่นที่มากขึ้นและอยู่ในช่วงแคบๆ ได้โดยตรง ชนิดที่สองคือใช้โพรบหนึ่งตัวที่ถูกติดฉลากด้วยทั้งฟลูออโรฟอร์และสารเคมีที่เรียกว่าเควินเชอร์ (Quencher) ซึ่งโดยปกติจะไม่สามารถวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากฟลูออโรฟอร์ได้ เพราะเควินเชอร์ซึ่งรับพลังงานต่อจากฟลูออโรฟอร์จะไม่ปลดปล่อยพลังงานหรือแสงออกมาให้เครื่องวัดได้ แต่เมื่อเกิดการต่อสายใหม่ของดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นในช่วงโพลิเมอไรเซชั่น (polymerization) จะทำให้ฟลูออโรฟอร์และเควินเชอร์ที่ติดกับตัวโพรบหลุดออกมาเป็นอิสระ และทำให้สามารถวัดแสงหรือพลังงานที่ฟลูออโรฟอร์ดูดกลืนและปลดปล่อยออกมาโดยไม่มีเควินเชอร์เป็นตัวยับยั้ง มักนิยมเรียกโพรบชนิดแรกว่าฮัยบริดไดเซชั่นโพรบ (hybridization probe) และโพรบชนิดที่สองว่าฮัยโดรลัยซิสโพรบ (hydrolysis probe) นอกจากประโยชน์ของ Real-time PCR ในการวัดปริมาณของสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นแล้ว Real-time PCR ที่ใช้หลักการของ FRET ยังมีประโยชน์ในการวิเคราะห์ทามิวเตชั่นที่เกิดขึ้นในยีนของมนุษย์ได้อีก นอกจากนี้ยังมีบริษัทต่างๆ ได้นำหลักการ Real-time PCR ไปสร้างเป็นชุดเครื่องมือตรวจหาปริมาณเชื้อโรคทั้งแบคทีเรียและไวรัสในตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ ที่เก็บได้จากผู้ป่วย

การวิเคราะห์การแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสในเนื้อเยื่อ (*In vivo* analysis of mRNA expression)

เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ได้แก่ *in situ* hybridization ซึ่งทำได้ในเนื้อเยื่อที่อยู่ในชิ้นผึ้งพาราฟิน (paraffin) หรือที่ถูกแช่แข็ง (frozen section) นอกจากนี้สามารถเลือกใช้โพรบได้ทั้งดีดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอโพรบ วิธีการติดฉลากโพรบสามารถทำได้สองวิธีคือใช้สารรังสี เช่น ซัลเฟอร์-35 ฟอสฟอรัส-32 เป็นต้น หรือใช้สารเคมีที่เรียกว่าดิจ็อกซีเจนิน (digoxigenin) ร่วมกับใช้ปฏิกิริยาทางเคมีและสารตั้งต้นได้แก่ Nitroblue Tetrazolium (NBT) และ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate (BCIP) ในการทำให้เกิดสีบนชิ้นเนื้อเยื่อ รูปที่ 2 แสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย *in situ* hybridization ด้วยโพรบที่ติดฉลากด้วยดิจ็อกซีเจนิน ขออธิบายขั้นตอนของเทคนิคนี้พอสังเขปดังนี้ หลังจากที่ได้เนื้อเยื่อบนสไลด์และทำการติดฉลากที่โพรบเรียบร้อยแล้ว ต้องดึงชิ้นผึ้งออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffinization) ก่อนในกรณีที่ใช้ชิ้นผึ้งพาราฟิน หลังจากนั้นย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนในเซลล์ด้วยเอ็นไซม์โปรติเอส (protease) ทำให้โพรบสามารถเข้าไปจับกับอาร์เอ็นเอได้ดีขึ้น และต่อมาย่อยด้วยเอ็นไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) เพื่อทำลายดีเอ็นเอในเซลล์เพื่อลดการแย่งจับกับโพรบ นอกจากนี้ยังช่วยลดสีพื้น (background) อีกด้วย หลังจากนั้นใส่โพรบเพื่อเข้าไปจับ



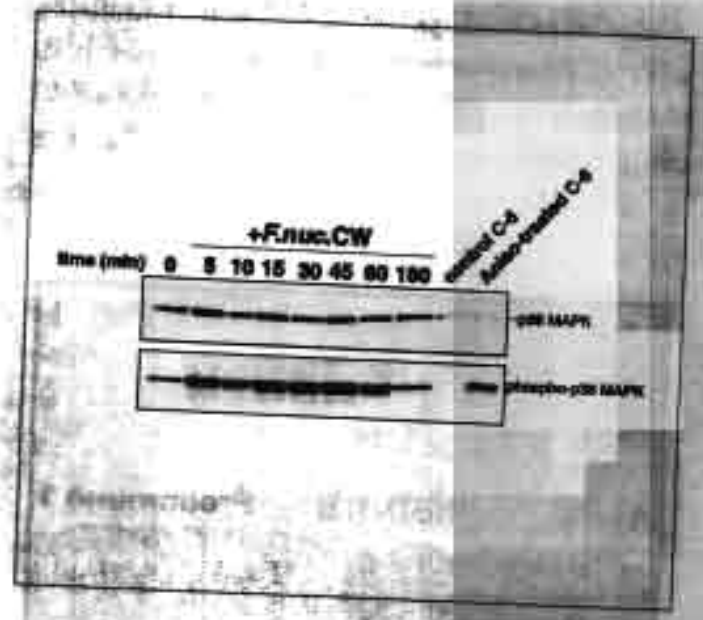
รูปที่ 2 การวิเคราะห์การแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสในเนื้อเยื่อ โดยเทคนิค in situ hybridization ร่วมกับโพรบที่ติดฉลากด้วยดิจ็อกซีเจนิน (ขยาย 40 เท่า) โพรบที่ใช้ในรูป A และ C เป็นชนิดแอนติเซนส์ (antisense) คือสามารถจับกับอาร์เอ็นเอนำรหัสคู่สมที่สนใจศึกษา และให้แสดงออกมาเป็นสีน้ำตาลดำตรงบริเวณที่มีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัส ในรูปนี้แสดงว่ามีการติดสีในชั้นเยื่อบุผิว ในขณะที่โพรบในรูป B และ D เป็นชนิดเซนส์ (sense) ซึ่งมีลำดับเบสเหมือนกับอาร์เอ็นเอนำรหัสซึ่งจะไม่จับกับอาร์เอ็นเอนำรหัสที่สนใจ จึงไม่ติดสีที่ชั้นเยื่อบุผิว ดังนี้จึงใช้เป็นตัวควบคุมที่ดีด้วย

Fig. 2 Analysis of mRNA expression in vivo by in situ hybridization and digoxigenin-labeled probe (x40). An antisense probe, which is complementary to the mRNA of interest, is used in panel A and C, while a sense probe in panel B and D, which has sequence identical to mRNA, is a negative control.

กับอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อ โดยปฏิกิริยาการจับ (hybridization) เกิดขึ้นในอุณหภูมิคงที่ตลอดช่วงเวลาข้ามคืน วันถัดไปทำการล้างสไลด์ในสารละลายที่เหมาะสม และดำเนินขั้นตอนของการตรวจหาตำแหน่งของอาร์เอ็นเอที่ถูกจับด้วยโพรบซึ่งจะขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการติดฉลากโพรบ ข้อควรระวังสำหรับการทำ *in situ* hybridization และเทคนิคอื่นๆ ที่ใช้วิเคราะห์อาร์เอ็นเอ คืออาร์เอ็นเอเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรถูกทำลายได้ง่าย ดังนั้นสารเคมีตลอดจนเครื่องมือทุกชนิดต้องปราศจากเอ็นไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase)

การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในหลอดทดลอง (*In vitro* analysis of protein expression)

เทคนิคที่ใช้คือ Western blot hybridization โดยใช้กระแสไฟฟ้าเพื่อแยกโปรตีนที่สกัดมาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ โดยใส่สารเคมีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต [sodium dodecyl sulfate (SDS)] ในสารที่ใช้สกัด ทำให้ประจุรวมของโปรตีนทุกๆ ชนิดเป็นประจุลบ นอกจากนี้ยังทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกและแยกโปรตีนออกมาจากเซลล์ได้ โปรตีนที่มีประจุลบจะวิ่งเข้าหาขั้วบวกบนวุ้นโพลีอะคริลามายด์ (polyacrylamide gel) การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้ากระทำในแนวตั้ง (vertical electrophoresis) ซึ่งต่างจากการแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอซึ่งกระทำได้ทั้งในแนวตั้งและแนวนอน (horizontal electrophoresis) นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยาในการทำให้วุ้นโพลีอะคริลามายด์แข็งตัวเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทางเคมีโดยสารเคมีที่ผสมเข้าไปเกิดการเชื่อมต่อไขว้กัน (cross-links) ซึ่งแตกต่างจากวุ้นอะกาโรสที่ใช้อุณหภูมิ โปรตีนจะถูกแยกไปบนวุ้นตามขนาดของโปรตีน โดยโปรตีนขนาดเล็กจะวิ่งได้เร็วและไกลกว่าโปรตีนขนาดใหญ่ หลังจากนั้นจะทำการถ่ายโปรตีนจากวุ้นไปบนเมมเบรนซึ่งมักทำด้วยไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) การส่งถ่ายโปรตีนนี้ต้องอาศัยแรงจากกระแสไฟฟ้า (electroblotting) ซึ่งต่างจากการส่งถ่ายอาร์เอ็นเอที่ใช้แรงนำพาจากบัฟเฟอร์ (capillary transfer) เมื่อส่งถ่ายโปรตีนไปสู่เมมเบรนแล้วจะมีการปิดกั้น (block) ตำแหน่งที่ไม่เฉพาะเจาะจงในการจับของแอนติบอดีด้วยนมผงพร่องมัน (non-fat dry milk) หรือสารเคมีชนิดอื่นๆ หลังจากนั้นใส่แอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ซึ่งอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเข้าไปจับโปรตีนแอนติเจนเป้าหมาย ต่อจากนั้นใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่ต่อเชื่อมกับเอ็นไซม์ มักนิยมใช้อยู่สองชนิดคืออัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และฮอร์สแรดิชเพอร็อกซิเดส (horseradish peroxidase) เข้าไปจับกับแอนติบอดีปฐมภูมิอีกครั้ง หลังจากนั้นจึงใช้วิธีตรวจสอบที่เหมาะสมสำหรับเอ็นไซม์แต่ละชนิด โดยการเติมสารตั้งต้นเข้าไปเพื่อให้เอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสีหรือแถบของโปรตีนที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือบางครั้งสารตั้งต้นที่ใส่เข้าไปก่อให้เกิดแสงที่เปล่งออกมาซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่าเคมี-ลูมิเนสเซนส์ (chemiluminescence) ดังนั้นจึงสามารถใช้ฟิล์มเอ็กซเรย์เข้าไปรับแสงที่เปล่งออกมาเพื่อบันทึกลักษณะของแถบโปรตีน รูปที่ 3 แสดงผลที่ได้จากเทคนิค western blot



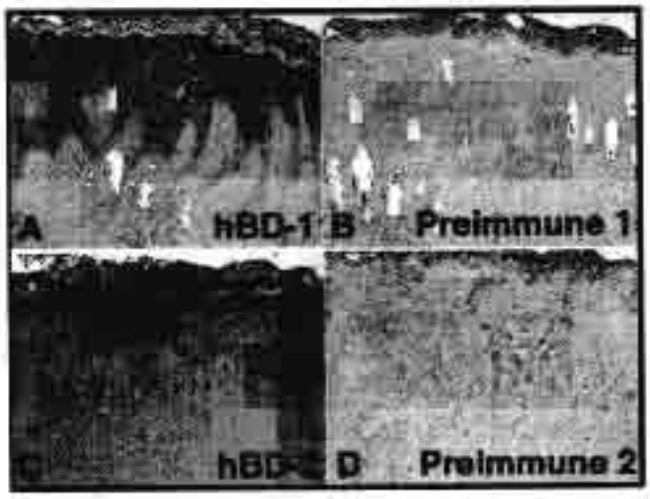
รูปที่ 3 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในหลอดทดลอง โดยเทคนิค Western blot hybridization สังเกตความจำเพาะของแอนติบอดีปฐมภูมิในการรับรู้โปรตีนตัวเดียวกันแต่อยู่ต่างสภาวะ คือ ตัวหนึ่งถูกเติมหมู่ฟอสเฟต (phospho-p38 MAPK) ในขณะที่อีกตัวไม่ถูกเติม (p38 MAPK) ทำให้เห็นที่ได้แสดงต่างกันคือกลุ่มตัวอย่างที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากเชื้อเซลล์ของจุลชีพที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์ที่มีชื่อว่า Fusobacterium nucleatum (+F.nuc. CW) ณ เวลาต่างๆ กัน ทำให้ระดับการแสดงออกของ phospho-p38 MAPK เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับหมู่ตัวอย่างควบคุม (ที่วัดา 0 นาที) ในขณะที่ระดับของ p38 MAPK ไม่มีการเปลี่ยนแปลง รูปนี้นำมาจาก Krisansaprakornkit และคณะ [4] โดยได้รับการอนุญาตดัดแปลงจากสมาคมนักภูมิคุ้มกันวิทยาประเทศสหรัฐอเมริกา

Fig. 3 *Analysis of protein expression in vitro by Western blot hybridization. Note the specificity of primary antibody to recognize the same protein, i.e. p38, but in different states, i.e. phosphorylation (phospho-p38 MAPK) and non-phosphorylation (p38 MAPK). This accounts for different results. This figure is reproduced with permission from Krisansaprakornkit et al., 2002 [4] (Copyright © 2002 by the American Association of Immunologists, Inc.).*

hybridization ร่วมกับ enhanced chemiluminescence หรือ ECL นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการพัฒนาให้แสงที่เปล่งออกมาเป็นแสงฟลูออเรสเซนต์ซึ่งทำให้ความไวในการตรวจหาโปรตีนสูงมากกว่าเทคนิค ECL ธรรมดาถึงประมาณ 4-20 เท่า และสามารถวัดระดับปริมาณของโปรตีนที่อยู่ในตัวอย่างได้แม่นยำมากขึ้น

การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อ (*In vivo* analysis of protein expression)

เทคนิคที่ใช้เรียกว่า immunohistochemistry ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แอนติบอดีปฐมภูมิเข้าไปจับกับแอนติเจนในเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นใช้แอนติบอดีทุติยภูมิที่ต่อเชื่อมกับเอ็นไซม์เข้าไปจับกับแอนติบอดีปฐมภูมิอีกทีหนึ่ง หลังจากนั้นใส่สารตั้งต้นเข้าไปเพื่อให้เอ็นไซม์ทำปฏิกิริยาจนทำให้เกิดสีและมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เทคนิคนี้ทำให้บอกตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อ (รูปที่ 4 แสดงถึงผลที่ได้จากเทคนิค immunohistochemistry) นอกจากนี้ยังสามารถใช้แอนติบอดีทุติยภูมิที่ต่อเชื่อมกับสารฟลูออโรฟอร์ (แทนเอ็นไซม์) ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงแล้วจะเปล่งพลังงานออกมาเป็นแสงสีต่างๆ โดยสามารถเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope)

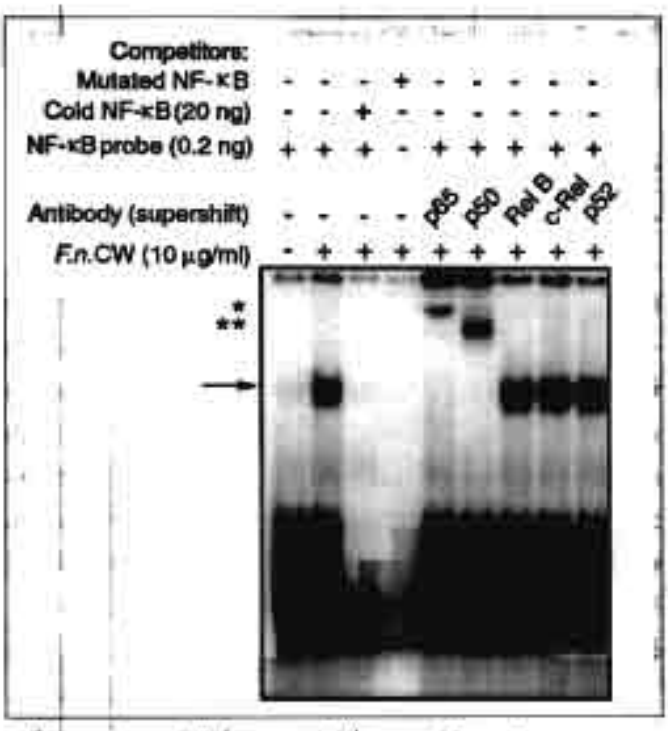


รูปที่ 4 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อ โดยเทคนิค immunohistochemistry สังเกตสีน้ำตาลที่ย้อมติดเซลล์ในชั้นเยื่อบุผิวด้วยการใช้แอนติบอดีปฐมภูมิต่อโปรตีนเยื่อ hBD-1 (A) และ hBD-2 (C) ภาพในรูป B และ D แสดงถึงตัวควบคุมที่ให้ผลลบคือไม่ติดสีน้ำตาล ด้วยการใช้ซีรั่มของกระต่ายก่อนที่จะฉีดแอนติเจนเข้าไป/ แทนการใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ เรียกซีรั่มนี้ว่า preimmune serum ต่อ hBD-1 (preimmune 1, B) และต่อ hBD-2 (preimmune 2, D) (ขยาย 100 เท่า)

Fig. 4 Analysis of protein expression in vivo by immunohistochemistry. Note the brown staining in epithelial cells with the use of primary antibodies against hBD-1 (A) and hBD-2 (C). Panel B (preimmune 1) and D (preimmune 2) represent a negative control for A and C, respectively (x100).

หลักการสำคัญในการตรวจหาโปรตีนไม่ว่าในหลอดทดลองหรือในเนื้อเยื่อคือต้องมีแอนติบอดีปฐมภูมิที่จับกับแอนติเจนเป้าหมายอย่างเฉพาะเจาะจง และต้องจับได้กับแอนติเจนที่อยู่ในรูปที่เสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) เนื่องจากขั้นตอนในการสกัดโปรตีนจากเซลล์ในหลอดทดลองหรือขั้นตอนการคงสภาพ (fixation) ของเนื้อเยื่อต้องใช้สารเคมีซึ่งทำให้โปรตีนเสียสภาพไป แบ่งชนิดของแอนติบอดีปฐมภูมิได้เป็นสองประเภทคือโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) สร้างมาจากฮัยบริโดม่าเซลล์ (hybridoma cells) ของหนู ดังนั้นแอนติบอดีทุติยภูมิที่จับจะเป็นชนิดที่จับกับโปรตีนของหนู (anti-mouse secondary antibody) แอนติบอดีปฐมภูมิอีกประเภทคือโพลีโคลนัลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งมักสร้างมาจากการฉีดแอนติเจนเข้าไปในกระต่ายและเก็บซีรั่มของกระต่ายมาเพื่อสกัดเอาแอนติบอดี ดังนั้นแอนติบอดีทุติยภูมิที่จับจะเป็นชนิดที่จับกับโปรตีนของกระต่าย (anti-rabbit secondary antibody) หลังจากที่ได้แอนติบอดีปฐมภูมิทั้งสองประเภทจะต้องมีการตรวจสอบชนิดของแอนติบอดีและทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงและความสามารถในการจับกับโปรตีนแอนติเจนเสียก่อน ซึ่งเทคนิคที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็น western และ dot blot hybridization การที่จะใช้แอนติบอดีชนิดไหนก็ขึ้นอยู่กับว่าสามารถหาแอนติบอดีได้ในท้องตลาดหรือไม่ ถ้าไม่สามารถหาซื้อได้ก็ต้องมีการสร้างขึ้นมาใช้เอง การสร้างโพลีโคลนัลแอนติบอดีจะง่ายและรวดเร็วกว่าการสร้างโมโนโคลนัลแอนติบอดี แต่ความเฉพาะเจาะจงต่อแอนติเจนจะน้อยกว่า ดังนั้นสิ่งที่สำคัญในการทดลองแต่ละครั้งคือต้องมีตัวควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) รวมอยู่ด้วยเสมอดังเห็นได้จากการใช้พรีอิมมูนซีรั่มจากกระต่ายแทนแอนติบอดีปฐมภูมิ (รูปที่ 4 B และ D)

นอกจากเทคนิค immunohistochemistry แล้วยังมีเทคนิคที่เรียกว่า immunocytochemistry ซึ่งเป็นเทคนิคที่ตรวจหาการแสดงออกและบ่งบอกตำแหน่งของโปรตีนภายในเซลล์ (ไม่ใช่ในเนื้อเยื่อ) ซึ่งหลักการโดยทั่วๆ ไปของเทคนิคนี้คล้ายกับ immunohistochemistry คือ



รูปที่ 6 การวิเคราะห์หน้าที่ของทรานสคริพชั่นแฟคเตอร์ โดยเทคนิค EMSA (4 เลนทางด้านซ้าย) และ gel supershift assay (5 เลนทางด้านขวา) รูปนี้นำมาจาก Krisanaprakornkit และคณะ [4] โดยได้รับการอนุญาตให้พิมพ์จากสมาคมผู้ภูมิคุ้มกันวิทยาประเทศสหรัฐอเมริกา ——→ แสดงถึงคีเอ็นเอโปรตีนคอมเพลกซ์ที่เกิดจากการจับกันของทรานสคริพชั่นแฟคเตอร์กับสายดีเอ็นเอ (หรือโพรบ) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะเจาะจงสำหรับทรานสคริพชั่นแฟคเตอร์ตัวนั้น และสายดีเอ็นเอนี้ถูกติดฉลากด้วยสารรังสีจึงทำให้สามารถตรวจหาได้ *, ** แสดงถึงคอมเพลกซ์ที่ช้าลงเมื่อเติมแอนติบอดีต่อทรานสคริพชั่นแฟคเตอร์แต่ละตัว สังเกตได้ว่าตำแหน่งคอมเพลกซ์ควงตำแหน่งลูกศรได้ลำไปอยู่ช้างบนตรงตำแหน่งคอมเพลกซ์ที่เนื่องจากแอนติบอดีต่อทรานสคริพชั่นแฟคเตอร์ p65 และ p50 ที่เข้ามาจับเพิ่มเติมทำให้คอมเพลกซ์มีขนาดใหญ่ขึ้นและวิ่งช้าลง สังเกตแถบด้านล่างเป็นแถบของโพรบอิสระส่วนเกินซึ่งไม่ได้จับกับโปรตีน

Fig. 6 Functional assays of transcription factor by EMSA (four left lanes) and gel supershift assay (five right lanes). This figure is reproduced with permission from Krisanaprakornkit et al., 2002 [4] (Copyright ©2002 by the American Association of Immunologists, Inc.). ——→ indicates DNA-protein complex; *, ** indicates retarded complexes due to added antibody against each transcription factor.

ประเภทคือ ทรานสเฟคชั่นชนิดเสถียร (stable transfection) ซึ่งดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปจะไปรวมกับโครโมโซมของเซลล์ โดยมักนิยมใช้ไวรัสเป็นพาหะ (vector) ในการนำดีเอ็นเอเข้าไปและรวมกับโครโมโซมของเซลล์หลังจากที่ใส่ดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์แล้วกระตุ้นเซลล์ด้วยสิ่งกระตุ้นต่างๆ ทำให้ทรานสคริพชั่นแฟคเตอร์ทำงานโดยเข้าไปจับกับลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างเอ็นไซม์ การวิเคราะห์การทำงานของทรานสคริพชั่นแฟคเตอร์ทำได้โดยวัดการทำงาน (activity) ของเอ็นไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาของสารตั้งต้นที่ใส่เข้าไป นอกจากนี้ยังสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (mutate) หรือทำให้หายไป (delete) ซึ่งทำให้ทราบว่าลำดับเบสตรงตำแหน่งใด มีความสำคัญต่อขบวนการทรานสคริพชั่นของยีนที่สนใจ

การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์ (Applications in dental research)

สามารถนำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนทุกชนิดที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาสร้างอวัยวะภายในช่องปาก หรือที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคในช่องปาก ทั้งในระดับอาร์เอ็นเอ่รหัสและโปรตีน ตัวอย่างเช่น ดูการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ โดยเฉพาะจากเนื้อเยื่อในช่องปากต่อการกระตุ้นด้วยจุลชีพ สารพิษจากจุลชีพ หรือสิ่งกระตุ้นอื่นๆ ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยอาจศึกษายีนที่สร้างไซโตคายน์ (cytokines) ยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอะพอพโตซิส (apoptosis) ของเซลล์ เป็นต้น นอกจากการทดลองกับเซลล์เพาะเลี้ยงแล้ว บางเทคนิคช่วยให้นักวิจัยตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจทั้งในระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสและโปรตีนในรอยโรค ผู้เขียนขอยกตัวอย่างโครงการวิจัยของตนเองที่กำลังดำเนินการอยู่คือการศึกษาการแสดงออกของแอนติไมโครเบียลเปปไทด์เบต้า-ดีเฟนซิน (hBD-1 และ hBD-2) ในรอยโรคไลเคนพลานัสในช่องปากและรอยโรคที่ติดเชื้อรา (รูปที่ 4) นอกจากนี้ดังที่ได้กล่าวข้างต้นว่าเทคนิค Real-time PCR สามารถนำมาประยุกต์ใช้หาปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกลุ่มอาการโรค (syndrome) ที่พบความผิดปกติในบริเวณใบหน้าและศีรษะ หรือการนำเทคนิคนี้มาหาปริมาณของจุลชีพที่สนใจในน้ำลายหรือของเหลวในร่องเหงือก (gingival crevicular fluid) ส่วนเทคนิคที่วิเคราะห์หน้าที่ของทรานสคริพชั่นแฟคเตอร์ร่วมกับ Western blot technique [รูปที่ 3 แสดงถึงการกระตุ้น p38 MAPK ซึ่งเป็นเส้นทางสื่อสัญญาณ (signaling pathway) เส้นทางหนึ่งด้วยจุลชีพ] มีประโยชน์ในการศึกษาเส้นทางสื่อสัญญาณ และทรานสคริพชั่นแฟคเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่สนใจ อันจะนำไปสู่วิธีการควบคุมให้ยีนที่สนใจนั้นแสดงออกมากขึ้นหรือลดน้อยลงตามที่ต้องการ

บทสรุป

ผู้เขียนได้พยายามรวบรวมเทคนิคต่างๆ ทางอณูชีววิทยา โดยได้แบ่งออกเป็นหัวข้อตามลักษณะการใช้ในงานวิจัย แต่ถึงอย่างไรก็ตามยังมีเทคนิคอื่นๆ อีกมาก อาทิ การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA isolation) การโคลนนิ่ง (cloning) การเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ (DNA ligation) การหาลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing) เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์การแสดงออกของยีนจำนวนมากๆ ในหนึ่งครั้ง (High throughput techniques) เป็นต้น ที่ผู้เขียนไม่ได้กล่าวไว้ในบทความนี้เนื่องจากความจำกัดของเนื้อที่ จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่าเกิดการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาขึ้นอย่างมากในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา ตั้งแต่ที่ Francis H.C. Crick และ James D. Watson ค้นพบโครงสร้างเส้นเกลียวคู่ (double helix) ของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ในปัจจุบันเทคนิคเหล่านี้ถูกใช้เป็นเครื่องมือในการทดลองวิทยาศาสตร์โดยเฉพาะในสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ ซึ่งผลงานวิจัยที่ได้มีส่วนอย่างมากในการผลักดันให้เกิดการสร้างองค์ความรู้ใหม่ๆ ซึ่งรวมไปถึงองค์ความรู้ใหม่ที่เกี่ยวข้องกับสาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่บุคลากรในคณะทันตแพทยศาสตร์และทันตแพทย์ทั่วๆไปจะต้องตระหนักถึงความรู้ทางด้านอณูชีววิทยาเพื่อพัฒนาตนเองให้ทันสมัยกับความก้าวหน้าทางวิทยาการที่เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2545 ที่สนับสนุนการตีพิมพ์บทความนี้ ขอขอบคุณ Professor Beverly A. Dale-Crunk (อาจารย์ที่ปรึกษา) และ Mrs. Janet R. Kimball ที่สนับสนุนข้าพเจ้ามาโดยตลอดและสอนเทคนิคต่างๆ เหล่านี้ให้กับข้าพเจ้าเมื่อครั้งที่ทำการศึกษาอยู่ที่มหาวิทยาลัยวอชิงตัน เมืองซีแอตเติล ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารอ้างอิง

1. Wu W, Welsh MJ, Kaufman PB, Zhang HH. Methods in Gene Biotechnology. New York: CRC Press; 1997. p. 225-258.
2. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA. Regulation of human β-defensin-2 by *Fusobacterium nucleatum* in gingival epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not NF-KB pathway. *J Immunol* 2002;168: 316-24.

Review Article

Techniques in Molecular Biology for Dental Research

*Suttichai Krisanaprakornkit**

Abstract

The central dogma of Molecular Biology is transcription and translation. Transcription is a process of RNA synthesis from DNA, whereas translation is a process of protein synthesis. Nowadays, knowledge and various techniques in Molecular Biology have increasingly become a useful tool for scientific experiments to understand molecular mechanisms of cell and organ development and disease pathogenesis. Conducting scientific research in Dentistry, which is part of Health Sciences, unavoidably requires basic and advanced techniques in Molecular Biology to implement the goals of research project. In this review article, these techniques are categorized according to their purposes, i.e. study of mRNA versus protein expression or *in vitro* versus *in vivo*. It is demanded for dental faculties and dentists to understand the basic principles of these techniques in which they can apply for their own research.

Key words : Immunocytochemistry; Immunohistochemistry; *In situ* hybridization; Molecular Biology; Northern blot hybridization; Western blot hybridization

* *Financial support by Post-Doctoral Grant, The Thailand Research Fund, 2002*

พยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลของโรคไลเคนพลานัส

Molecular Pathogenesis of Lichen Planus

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ

สำเนาพิมพ์ จาก เชียงใหม่ทันตแพทยสาร
ปีที่ 24 ฉบับที่ 1-2 มกราคม-ธันวาคม 2546

Reprinted from CHIANG MAI DENTAL JOURNAL
vol. 24 No. 1-2 January-December 2003

พยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลของโรคไลเคนพลานัส
Molecular Pathogenesis of Lichen Planus

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ
ภาควิชาทันตวิทยา-พยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Suttichai Krisanaprakornkit
Department of Odontology & Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Chiang Mai University

ชม.ทันตสาร 2546; 24(1-2)
CM Dent J 2003; 24(1-2)

บทคัดย่อ

ไลเคนพลานัสเป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรังบริเวณเยื่อบุผิวและผิวหนังซึ่งไม่ทราบสาเหตุ และยังไม่ทราบถึงพยาธิกำเนิดของไลเคนพลานัสในระดับโมเลกุลที่แน่ชัด สองสมมติฐานซึ่งได้แก่ กลไกที่เกี่ยวข้องกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงกับที่ไม่เฉพาะเจาะจงได้ถูกเสนอเพื่อที่จะอธิบายผลการทดลองจำนวนมากซึ่งถูกรายงานไว้ตั้งแต่ทศวรรษที่แล้ว กลไกที่เกี่ยวข้องกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงได้แก่ขบวนการนำเสนอแอนติเจนและการทำลายเซลล์เคอราติโนซัยท์โดยซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์ที่เป็นพิษ ในขณะที่กลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงเกี่ยวข้องการปลดปล่อยสารจากแกรนูลของแมสท์เซลล์และการกระตุ้นการทำงานของแมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส ผลสุดท้ายของทั้งสองกลไกนี้เห็นได้จากลักษณะทางจุลวิทยาที่พบในไลเคนพลานัส ซึ่งประกอบด้วยการสะสมของที-ลิมโฟซัยท์ การทำลายเบสเมนท์เมมเบรนและการตายของเซลล์ในชั้นเบซัล (หรือการตายของเซลล์เคอราติโนซัยท์แบบอะพอพโตซิส) นอกจากนี้หลักฐานหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์เคอราติโนซัยท์แบบอะพอพโตซิส ได้แก่ การกระตุ้นเอ็นไซม์คาสเปส-3 และการตัดโพลี (เอดีพี-ไรโบส)โพลีเมอเรส ได้ถูกเสนอไว้ในบทความปริทัศน์นี้ แต่อย่างไรก็ตามยังจำเป็นที่จะต้องศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมเพื่อทำให้เข้าใจถึงสาเหตุและพยาธิกำเนิดของไลเคนพลานัสอย่างถ่องแท้

คำไขรหัส : ไลเคนพลานัส พยาธิกำเนิด อะพอพโตซิส

Abstract

Lichen planus is a chronic mucocutaneous inflammatory disorder of unknown etiology. The pathogenesis of lichen planus at the molecular level has not yet been known. Two hypotheses, i.e. antigen-specific versus non-specific mechanisms, are proposed in order to explain a number of experimental results that have been reported since the last decade. Antigen-specific mechanisms include antigen presentation and antigen-specific killing by CD8 cytotoxic T-lymphocytes, while non-specific mechanisms involve mast cell degranulation and matrix metalloproteinase activation. The final consequences of these two mechanisms are apparent from the histological findings of lichen planus, which include accumulation of T-lymphocytes, basement membrane disruption, and basal cell degeneration (or keratinocyte apoptosis). In addition, several lines of evidence regarding keratinocyte apoptosis in oral lichen planus, i.e. activation of caspase-3 and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase, have been presented in this review article. However, additional studies are still required for a thorough understanding of the etiology and pathogenesis of lichen planus.

Key Words : lichen planus, pathogenesis, apoptosis

บทนำ

โรคไลเคนพลานัสในช่องปาก (oral lichen planus) เป็นโรคที่เกิดจากขบวนการอักเสบอย่างเรื้อรังที่ผิวเยื่อเมือกโดยอาศัยเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ (T-lymphocyte) เป็นสื่อ โดยพบจำนวนเซลล์บี-ลิมโฟซัยท์ (B-lymphocyte) พลาสมาเซลล์ (plasma cell) อิมมูโนกลอบูลิน (immunoglobulin) และคอมพลีเมนท์ (complement) ในรอยโรคเล็กน้อยเท่านั้น[1] นอกจากนี้ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงในซีรั่ม (serum) ของผู้ป่วย ไลเคนพลานัสมีลักษณะทางคลินิกหลายลักษณะ (ดูรายละเอียดบทความปริทัศน์เรื่องไลเคนพลานัสในช่องปาก : ลักษณะทางคลินิกและการรักษา) โรคนี้พบได้บ่อยที่เยื่อบุกระพุ้งแก้ม ลิ้น และเหงือก พบโรคนี้ได้ประมาณร้อยละ 1-2 ของประชากรผู้ใหญ่ที่อายุมากกว่า 40 ปี ถึงแม้ว่าพบได้ในเด็กหรือวัยรุ่นบ้าง[2] นอกจากนี้ยังเป็นโรคเยื่อบุผิวช่องปากและไม่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในคลินิกเวชศาสตร์ช่องปาก (Oral Medicine Clinic) พบว่าผู้หญิงเป็นโรคนี้มากกว่าผู้ชาย 1.4 เท่า[3] โดยปกติพบไลเคนพลานัสทั้งสองข้าง และพบรอยโรคชนิดฝ่อลีบ (atrophic) หรือแผลถลอก (erosive) ได้บ่อยซึ่งทำให้ผู้ป่วยรู้สึกปวดแสบปวดร้อนและมาพบทันตแพทย์ ในบางครั้งพบรอยโรคบนผิวหนังบริเวณข้อมือ ข้อเท้า และอวัยวะเพศ ร่วมกับรอยโรคในช่องปาก ลักษณะที่พบจะเป็นตุ่มนูนแบนๆ (papules) บางครั้งพบรอยโรคที่เล็บจนทำให้เล็บหลุด หรือที่หนังศีรษะจนทำให้ผมร่วงและเกิดแผลเป็น แต่สิ่งที่น่าสนใจคือไม่พบว่ารอยโรคที่เยื่อบุผิวตามหลอดอาหาร และกล่องเสียง[4]

ลักษณะทางจุลวิทยาของไลเคนพลานัส (Histological features of lichen planus)

รูปที่ 1A แสดงถึงความหนาของชั้นเยื่อบุผิวในไลเคนพลานัสด้วยการย้อมเคอราตินซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของเซลล์เคอราติโนซัยท์ พบเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์จำนวนมากอยู่ใต้เยื่อบุผิว (lymphocytic band) (รูปที่ 2A) และในเยื่อบุผิว (intra-epithelial T-lymphocyte) (รูปที่ 1B) พบมีการทำลายเซลล์เคอราติโนซัยท์ (keratinocyte) ในชั้นเบซัล (basal layer) และเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่าคอลลอยด์ บอดีส์ [colloid (civatte, hyaline, cytoid) bodies] ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดกลมติดสีชมพู นอกจากนี้พบ

รูปที่ 1 การปรากฏของที-ลิมโฟซัยท์ในชั้นเยื่อบุผิวของไลเคนพลานัส (A) ชิ้นเนื้อไลเคนพลานัสถูกย้อมด้วยโมโนโคลนัล แอนติบอดี ต่อเคอราตินชนิดที่เป็นด่าง (AE3) เพื่อแสดงขอบเขตของชั้นเยื่อบุผิวในชิ้นเนื้อ เส้นที่มีลูกศรทั้งสองปลายแสดงถึงความหนาของชั้นเยื่อบุผิว (B) ชิ้นเนื้อเดียวกันที่ถูกย้อมด้วยโมโนโคลนัล แอนติบอดีต่อที-ลิมโฟซัยท์ที่ถูกกระตุ้นการทำงาน (CD45RO) หัวลูกศร แสดงให้เห็นถึงที-ลิมโฟซัยท์ที่อยู่ในชั้นเยื่อบุผิว ขยายจากขนาดดั้งเดิม 10 เท่า

Figure 1 The presence of intra-epithelial T-lymphocytes in lichen planus. (A) Lichen planus biopsies were stained with monoclonal antibody against basic keratins (AE3) to indicate the area of epithelium in the section. A line with double arrowheads indicates the epithelial thickness. (B) The same specimen was stained with monoclonal antibody against activated T-lymphocytes (CD45RO). Arrowheads indicate intra-epithelial T-lymphocytes. Original magnification 10X.

การทำลายเบสเมนท์เมมเบรน (basement membrane)[5] ทำให้ขาดและไม่ต่อเนื่อง (รูปที่ 2B) มีการทำลายโครงสร้างเฮมิเดสโมโซม (hemidesmosome) และเส้นใยต่างๆ ที่ยึดชั้นเยื่อบุผิวกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจนทำให้เยื่อบุผิวหลุดออกมาจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยพบว่ามีการสะสมของไฟบริน (fibrin) และไฟบริโนเจน (fibrinogen) จำนวนมากแทนโมเลกุลที่พบในสภาวะปกติของเบสเมนท์เมมเบรน เช่น ลามินิน (laminin) เป็นต้น[6] บางครั้งอาจพบตุ่มน้ำเกิดขึ้นในบริเวณรอยโรค (bullous lichen planus) และยังพบว่าชั้นเยื่อบุผิวหนาตัวขึ้น (acanthosis) วิธีการตรวจด้วยอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์ (immunofluorescent) ไม่ได้เป็นวิธีการให้การวินิจฉัยรอยโรคไลเคนพลานัส[7] เนื่องจากไม่พบการสะสมของอิมมูโนกลอบูลินและคอมพลีเมนท์ในรอยโรคทุกครั้ง ซึ่งไม่เหมือนกับเพมฟิกัส วัลการิส (pemphigus vulgaris) หรือบุลลัส เพมฟิกอยด์ (bullous pemphigoid)

สาเหตุของโรคนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่มีผู้เสนอสมมติฐาน[1] ของการเกิดโรคไว้ 2 แนวทางคือ

รูปที่ 2 การไม่ปรากฏพบเบสเมนท์เมมเบรนในไลเคนพลานัส (A) ลักษณะทางจุลวิทยาของไลเคนพลานัส ย้อมด้วยเฮมาทอกซีลิน เส้นที่มีลูกศรทั้งสองปลายแสดงถึงความหนาของชั้นเยื่อบุผิว (B) ชิ้นเนื้อเดียวกันที่ถูกย้อมด้วยโพลีโคลนัล แอนติบอดีต่อลามินิน สังเกตว่าไม่พบการติดสีที่เบสเมนท์เมมเบรนซึ่งอยู่ตรงรอยต่อของชั้นเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน แต่พบการติดสีรอบ ๆ เส้นเลือดในรอยโรค ซึ่งยังคงมีชั้นเบสเมนท์เมมเบรนอยู่ (หัวลูกศร) ขยายจากขนาดดั้งเดิม 10 เท่า

***Figure 2** The absence of basement membrane in lichen planus. (A) Histological features of lichen planus stained with H&E. A line with double arrowheads indicates the epithelial thickness. (B) The same specimen was stained with polyclonal antibody against laminin. Note the absence of staining at basement membrane lying between epithelium and connective tissue, but the presence of staining around blood vessels, which still have intact basement membrane (arrowheads). Original magnification 10X.*

1. เป็นโรคที่เกิดจากแอนติเจน (antigen) ที่เฉพาะเจาะจงในการกระตุ้นที-ลิมโฟซัยท์

2. กลไกการเกิดโรคไม่เฉพาะเจาะจงและไม่เกี่ยวข้องกับแอนติเจน

สมมติฐานที่ 1 เกี่ยวข้องกับความเฉพาะเจาะจงของแอนติเจน

ซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์ (CD8 T-lymphocyte)

ชนิดของที-ลิมโฟซัยท์ที่พบส่วนใหญ่ในชั้นเยื่อบุผิว ได้แก่ ชั้นเยื่อบุผิว และบริเวณที่มีการทำลายเซลล์เคอราติโนซัยท์ในชั้นเบซัลคือ ซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์ ดังนั้นซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์จึงน่าจะเกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์เคอราติโนซัยท์ มีรายงานการศึกษา[8] พบว่าที-ลิมโฟซัยท์ที่สกัดได้จากไลเคนพลานัสเป็นพิษ (cytotoxic) ต่อเซลล์เคอราติโนซัยท์ที่ได้จากรอยโรคเองมากกว่าที-ลิมโฟซัยท์ที่สกัดจากตำแหน่งปกติในผู้ป่วยรายเดียวกัน ส่วนที-ลิมโฟซัยท์ที่ไม่เป็นพิษจะเป็นชนิดซีดีสี่ (CD4) นอกจากนี้เมื่อทำการยับยั้งโมเลกุลเอ็มเอชซี คลาสวัน (MHC class I) โดยการเติมแอนติบอดี (antibody) เข้าไปกั้นไว้ จะทำให้ความเป็นพิษของซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์ถูกยับยั้ง[8] จึงเป็นไปได้ว่าซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์อาจจะรับรู้แอนติเจนที่ถูกเสนอโดยเซลล์เคอราติโนซัยท์บริเวณรอยโรคโดยผ่านทางโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสวันบนเซลล์เคอราติโนซัยท์ หลังจากที่มีการรับรู้แอนติเจนแล้ว ซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์จะกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เคอราติโนซัยท์ นอกจากนี้ซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์ และเซลล์เคอราติโนซัยท์อาจจะปล่อยคีโมคายน์ (chemokine) ซึ่งจะช่วยชักนำลิมโฟซัยท์และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ เข้ามาที่บริเวณรอยโรคมากขึ้น[9,10]

ความเกี่ยวข้องระหว่างซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์และเซลล์เคอราติโนซัยท์

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เคอราติโนซัยท์ในการทำหน้าที่เสนอแอนติเจน[11] ทำให้เกิดการกระตุ้นซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์ ซึ่งเข้ามาในรอยโรคเพราะว่าเซลล์เหล่านี้เข้ามาตรวจตราในเยื่อบุผิวเป็นประจำอยู่แล้ว (routine surveillance) ซึ่งจะพบกับเซลล์เคอราติโนซัยท์ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยบังเอิญ (chance encounter hypothesis) หรือเป็นไปได้ว่าซีดีแปดถูกชักนำเข้ามาในรอยโรคโดยคีโมคายน์ที่สร้างจากเซลล์เคอราติโนซัยท์ที่เปลี่ยนแปลง (directed migration hypothesis) โดยมีผลการศึกษาที่สนับสนุนสมมติฐานทั้งสองนี้ เช่น พบซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์ในเยื่อบุผิวปกติได้บ้าง[12] ส่วนอีกสมมติฐานหนึ่งถูกสนับสนุนโดยการพบตัวรับสัญญาณ (receptor) ต่อคีโมคายน์ที่สร้างจากเซลล์เคอราติโนซัยท์บนที-ลิมโฟซัยท์[13] โดยสรุปเหตุการณ์เริ่มต้นของการเกิดไลเคนพลานัสอาจจะเกิดจากเซลล์เคอราติโนซัยท์เสนอแอนติเจนทางโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสวัน ในตำแหน่งที่จะเป็นรอยโรคในอนาคต โดยอาจจะมีการกระตุ้นการสร้างคีโมคายน์จากเซลล์เคอราติโนซัยท์หรือไม่ก็ได้ หลังจากนั้นซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์จะเข้ามาสู่รอยโรคโดยเข้ามาตรวจตราเป็นปกติหรือถูกชักนำเข้ามาโดยคีโมคายน์ และจะกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เคอราติโนซัยท์ในชั้นเบซัล การสะสมของที-ลิมโฟซัยท์ใต้ชั้นเยื่อบุผิวและการทำลายเบสเมนท์เมมเบรน ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงหลังอาจจะเป็นผลที่ตามมาจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์เคอราติโนซัยท์ที่เสนอแอนติเจนเฉพาะและที-ลิมโฟซัยท์

ชนิดและตำแหน่งของแอนติเจนเฉพาะที่ทำให้เกิดไลเคนพลานัส

ไม่มีใครทราบชนิดของแอนติเจนเฉพาะ ถึงแม้แอนติเจนนี้จะเป็นเพ็ปไทด์ (peptide) ในเซลล์เคอราติโนซัยท์เอง ถ้าเป็นเช่นนี้จริงโรคไลเคนพลานัสก็จะจัดเป็นโรคภูมิคุ้มกันต้านเนื้อเยื่อตัวเอง (autoimmune disease) โดยมีข้อมูลสนับสนุนอาทิ โรคนี้เป็นโรคเรื้อรัง เกิดขึ้นในผู้ใหญ่ พบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย เกี่ยวข้องกับโรคภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตัวเองอื่นๆ พบโคลน (clone) ของที-ลิมโฟซัยท์ที่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อตัวเองในรอยโรคนี้ สรุปได้ว่าเหตุการณ์เริ่มแรกของโรคนี้อาจจะเกิดขึ้นจากมีการนำเสนอแอนติเจนโดยเซลล์เคอราติโนซัยท์จากการกระตุ้นของยา การสัมผัสกับสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ (allergen) ในวัสดุอุดหรือยาสีฟัน ภยันตรายจากการกระแทก การติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส หรือสารอื่นๆ ที่ยังไม่ทราบชนิด ต่อมา ซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์จะรับรู้แอนติเจนโดยผ่านทางโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสวันที่อยู่บนเซลล์เคอราติโนซัยท์ในบริเวณรอยโรคและกระตุ้นทำให้เซลล์เคอราติโนซัยท์ตาย

ฮีทช็อคโปรตีน (Heat-shock proteins)

การแสดงออกของฮีทช็อคโปรตีนในโรคไลเคนพลานัส[14,15] อาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเนื่องจากขบวนการอักเสบที่มีอยู่แล้วในรอยโรค หรือการกระตุ้นการแสดงออกของฮีทช็อคโปรตีนโดยเซลล์เคอราติโนซัยท์อาจจะเป็นเส้นทางร่วมที่เชื่อมต่อระหว่างสารเคมีภายนอกที่ได้กล่าวแล้ว เช่น ยา สารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ การติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส ที่มากระตุ้นเซลล์ทำให้เกิดโรค จึงอาจเป็นไปได้ว่า ฮีทช็อคโปรตีนที่สร้างมากขึ้นจากเซลล์เคอราติโนซัยท์จะกระตุ้นให้เซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ทำลายเซลล์เคอราติโนซัยท์ในรอยโรค นอกจากฮีทช็อคโปรตีนที่ถูกสร้างมากขึ้น เพ็ปไทด์ขนาดเล็กๆ ชื่อว่าเบต้า-ดีเฟนซิน (β-defensins) ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อโรคและเกี่ยวข้องกับการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune response) และขบวนการอักเสบ (inflammatory response) ก็ถูกสร้างมากขึ้นในไลเคนพลานัสเช่นเดียวกัน[16] ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเบต้า-ดีเฟนซินอาจมีส่วนร่วมในพยาธิกำเนิดของไลเคนพลานัส

กลไกในการทำลายเซลล์เคอราติโนซัยท์

ในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกที่ซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์กระตุ้นการตายของเซลล์เคอราติโนซัยท์ แต่กลไกที่เป็นไปได้ประกอบด้วย 1. ที-ลิมโฟซัยท์หลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟ่า (tumor necrosis factor-α; TNF-α) และไปจับกับตัวรับสัญญาณของ TNF-α (TNFR1) บนผิวเซลล์เคอราติโนซัยท์ 2. ฟาส ไลแกนด์ (Fas Ligand) บนผิวเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์จับกับ ฟาส (Fas) บนผิวเซลล์เคอราติโนซัยท์ หรือ 3. ที-ลิมโฟซัยท์หลั่งเอ็นไซม์แกรนซายม์บี (granzyme B) และเข้าไปในเซลล์เคอราติโนซัยท์ทางรูเปิดบนผิวเซลล์ หลังจากนั้นจะกระตุ้นเอ็นไซม์คาสเปส (caspase) ที่มีหลายชนิดและทำงานต่อเนื่องกัน (cascade) ในเซลล์เคอราติโนซัยท์ทำให้เกิดการตายแบบที่เรียกว่าอะพอพโตซิส (apoptosis) มีรายงานการทดลองที่ยืนยันกลไกอันแรก[17,18] คือพบ TNF-α สูงขึ้นในซีรั่มของผู้ป่วยไลเคนพลานัส และ ที-ลิมโฟซัยท์ที่สกัดจากรอยโรคสร้างอาร์เอ็นเอนำรหัส (messenger RNA) ของ TNF-α และหลั่ง TNF-α ออกมา นอกจากนี้ยังพบว่า TNF-α แสดงออกในที-ลิมโฟซัยท์ใต้ชั้นเยื่อบุผิวและที่ติดกับเซลล์เคอราติโนซัยท์ และพบตัวรับสัญญาณของ TNF-α (TNFR1) แสดงออกบนเซลล์เคอราติโนซัยท์ในชั้นเบซัลและที่อยู่เหนือชั้นเบซัล สรุปได้ว่าซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์อาจจะหลั่ง TNF-α ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เคอราติโนซัยท์โดยผ่านทาง TNFR1

ซีดีสี่ ที-ลิมโฟซัยท์ (CD4 T-lymphocytes)

นอกจากพบซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์จำนวนมากในชั้นเยื่อบุผิวแล้วยังพบซีดีสี่ที-ลิมโฟซัยท์จำนวนมากในชั้นลามินา โพรเพรีย (lamina propria) เป็นไปได้ว่าลักษณะทางคลินิกของไลเคนพลานัสขึ้นอยู่กับสมดุลย์ระหว่างปริมาณของซีดีแปดและซีดีสี่ที-ลิมโฟซัยท์ นอกจากนี้บทบาทของซีดีสี่ที-ลิมโฟซัยท์จะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสทู (MHC class II) ที่ถูกสร้างมากขึ้นบนเซลล์ที่เสนอแอนติเจน เช่น แลนเกอร์ฮานส์เซลล์ (Langerhans cell) ที่พบจำนวนมากขึ้นในไลเคนพลานัส หรือ เคอราติโนซัยท์ และ ทีเซลล์รีเซ็พเตอร์ (T cell receptor; TCR) บนซีดีสี่ที-ลิมโฟซัยท์ ซึ่งจะไปกระตุ้นให้ซีดีสี่ที-ลิมโฟซัยท์หลั่งอินเตอร์ลิวคิน-2 (interleukin-2; IL-2) และอินเตอร์เฟียรอนแกมม่า (interferon-gamma; IFN-γ) ซึ่งจะไปกระตุ้นซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์แล้วทำให้เกิดขบวนการอะพอพโตซิสของเซลล์เคอราติโนซัยท์ นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่ามีการสร้างโมเลกุล ซีดีสี่สิบ

(CD40) และ ซีดีแปดสิบ (CD80) มากขึ้นและมีการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-12 จากเซลล์ที่เสนอแอนติเจน ซึ่งจะกระตุ้นเซลล์ซีดีสี่ที-ลิมโฟซัยท์ให้สร้างและหลั่ง IFN-γ มากขึ้นในรอยโรคไลเคนพลานัส[19] เป็นไปได้ว่าการสร้างและหลั่งของ IFN-γ ที่เพิ่มขึ้นตรงบริเวณรอยโรคช่วยทำให้มีการแสดงออกของโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสทูบนเซลล์เคอราติโนซัยท์อยู่ตลอดเวลาซึ่งส่งเสริมให้โรคนี้เป็นเรื้อรัง ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของไลเคนพลานัส สรุปได้ว่ารูปแบบของโมเลกุลที่แสดงออกบนเซลล์แต่ละชนิดหรือโมเลกุลที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์บ่งชี้ถึงกลไกการเกิดพยาธิกำเนิดของโรคว่าเป็นแบบระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เป็นสื่อ (cell-mediated immunity)

แอนติเจนหนึ่งหรือสองชนิด ?

ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่ามีแอนติเจนกี่ชนิดและอะไรบ้างที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคไลเคนพลานัส เป็นไปได้ว่าจะเป็นแอนติเจนเพียงชนิดเดียวที่ถูกเสนอบนทั้งโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสวันและคลาสทู หรืออาจจะเป็นแอนติเจนคนละชนิด แต่สิ่งที่สำคัญคือว่าแอนติเจนจะต้องถูกเสนอบนเอ็มเอชซีทั้งสองโมเลกุลนี้พร้อมๆ กัน เพื่อทำให้เกิดการกระตุ้นที-ลิมโฟซัยท์ทั้งสองชนิดไปพร้อมๆ กันและทำให้เกิดโรคขึ้น นอกจากนี้ทั้งซีดีสี่และซีดีแปด ที-ลิมโฟซัยท์สามารถกระตุ้นกันไปมาได้อีก

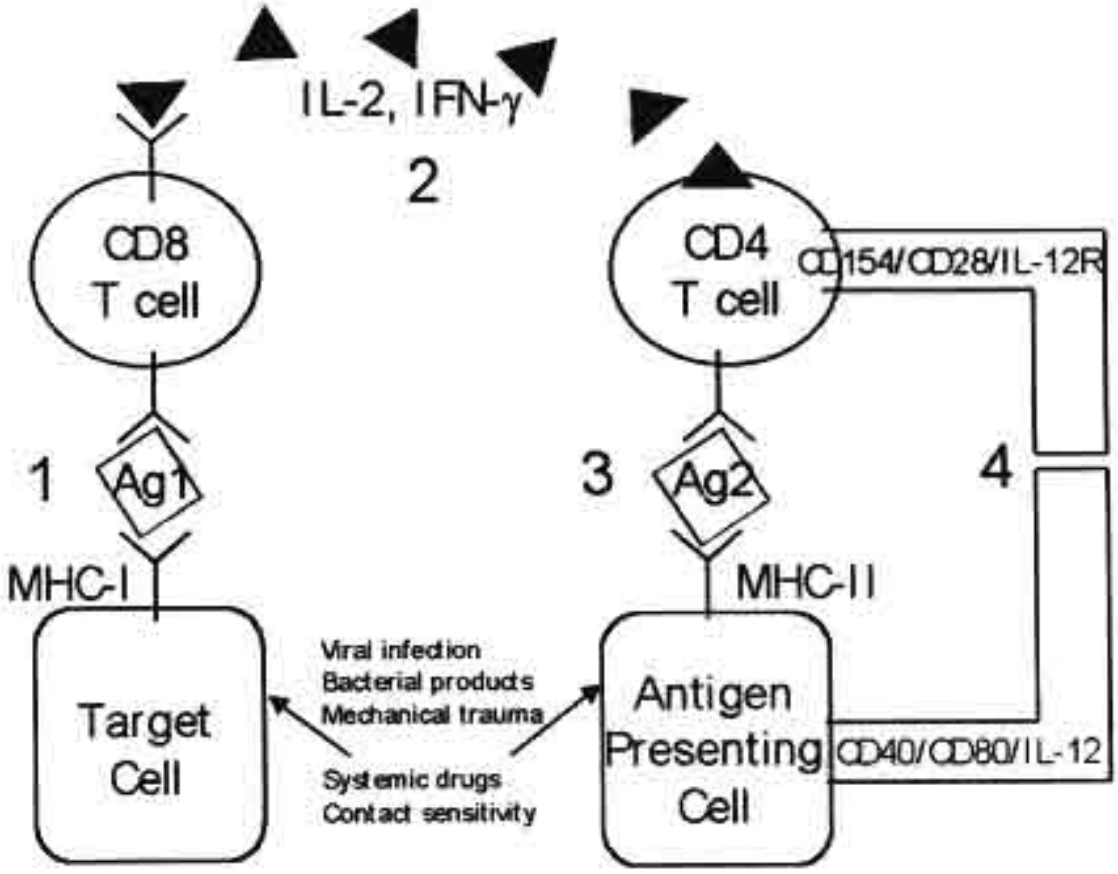
ชนิดของซัยโตคายน์ (Cytokine) ที่ถูกหลั่งออกมาจากที-ลิมโฟซัยท์

พบว่าเป็นชนิดที่ถูกสร้างจากที-เฮลพ์เปอร์เซลล์ชนิดที่ 1 (T-helper cell 1; Th1) เพราะว่าสามารถตรวจพบ IFN-γ และ TNF-α ในรอยโรคไลเคนพลานัสแต่ตรวจไม่พบซัยโตคายน์ที่ถูกสร้างจากที-เฮลพ์เปอร์เซลล์ชนิดที่ 2 (Th2) ซึ่งได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน-4 และ -10[18] โมเลกุลต่างๆ บนเยื่อบุผิวของเซลล์ที่เสนอแอนติเจน เช่น ซีดีสี่สิบ ซีดีแปดสิบ และ เอ็มเอชซีคลาสทู หรือซัยโตคายน์ที่ถูกหลั่งมาจากเซลล์ที่เสนอแอนติเจน คือ อินเตอร์ลิวคิน-12 กระตุ้นให้ที-ลิมโฟซัยท์เปลี่ยนไปเป็น Th1 และมีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณของแต่ละโมเลกุลที่อยู่บนเยื่อบุผิวของ Th1 นี้ได้แก่ ซีดีหนึ่งร้อยห้าสิบสี่ (CD154; CD40 receptor) ซีดียี่สิบแปด (CD28; CD80 receptor) และตัวรับสัญญาณของ IL-12 ซึ่งเป็นเครื่องบ่งชี้ว่าไลเคนพลานัสเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เป็นสื่อโดยผ่านทาง Th1 ดังนั้นถ้ายับยั้งการออกฤทธิ์ของโมเลกุลเหล่านี้เช่น IFN-γ, TNF-α, ซีดีแปดสิบ ซีดีสี่สิบ อินเตอร์ลิวคิน-12 โดยใช้ตัวยับยั้ง (inhibitor) ก็น่าจะมีผลในการรักษาไลเคนพลานัส แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาดังกล่าวในไลเคนพลานัส นอกเหนือไปจากการศึกษาในโรคภูมิคุ้มกันต้านเนื้อเยื่อตัวเองชนิดอื่นๆ เช่นโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคมัลติเพิล สเคลอโรซิส (multiple sclerosis)[20,21] เป็นต้น

สรุปสมมติฐานที่ 1 เกี่ยวกับการนำเสนอแอนติเจนและการกระตุ้นที-ลิมโฟซัยท์

ซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์อาจจะจับกับแอนติเจนสิ่งแปลกปลอมร่วมกับโมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสวันที่อยู่บนเคอราติโนซัยท์ในชั้นเบซัล (หมายเลข 1 รูปที่ 3) หลังจากนั้นซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์อาจจะต้องการสัญญาณเพิ่มเติมจากซีดีสี่ที-ลิมโฟซัยท์ให้ทำลายเซลล์เป้าหมายซึ่งก็คือเคอราติโนซัยท์ในชั้นเบซัล โดยผ่านทาง IL-2 และ IFN-γ (หมายเลข 2 รูปที่ 3) ซึ่งถูกสร้างและปลดปล่อยมาจาก Th1 ที่เปลี่ยนแปลงมาจากซีดีสี่ที-ลิมโฟซัยท์โดยสัญญาณที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง TCR-แอนติเจน (อาจจะเป็นคนละชนิดกับแอนติเจนข้างบน)-โมเลกุลเอ็มเอชซีคลาสทู (หมายเลข 3 รูปที่ 3) ซึ่งแสดงออกมาจากเซลล์ที่เสนอแอนติเจน ซึ่งอาจจะเป็นแลนเกอร์ฮานส์เซลล์หรือเซลล์เคอราติโนซัยท์เอง นอกจากนี้ยังมีโมเลกุลอื่นๆ ที่มีส่วนร่วมในการกระตุ้น ได้แก่ ซีดีสี่สิบ ซีดีแปดสิบ และ อินเตอร์ลิวคิน-12 บนเยื่อบุผิวเซลล์ที่เสนอแอนติเจน และ ซีดีหนึ่งร้อยห้าสิบสี่ ซีดียี่สิบแปด และตัวรับสัญญาณของอินเตอร์ลิวคิน-12 บนเยื่อบุผิวเซลล์ซีดีสี่ที-ลิมโฟซัยท์ (หมายเลข 4 รูปที่ 3) สมมติฐานนี้แสดงว่าซีดีสี่ และซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์ต้องจับกับแอนติเจนสิ่งแปลกปลอมที่ถูกเสนอขึ้นมาบนโมเลกุลเอ็มเอชซี และเกี่ยวข้องกับเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์เคอราติโนซัยท์ นอกจากนี้สมมติฐานนี้ยังอธิบายกลไกในการปกป้องไม่ให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันต้านเนื้อเยื่อตัวเองโดยไม่จำเป็น เพราะว่าจำเป็นต้องอาศัยสัญญาณมาจากทั้งปฏิกิริยาที่เกิดกับซีดีแปด และซีดีสี่ที-ลิมโฟซัยท์ถึงจะทำให้เกิดการทำลายเคอราติโนซัยท์และเกิดโรคในที่สุด

จากสมมติฐานนี้การกระตุ้นที-ลิมโฟซัยท์ให้ทำงานเป็นสิ่งจำเป็น แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาโดย Sugerman และคณะ[8] พบว่าไม่ใช่ซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์ทั้งหมดที่ถูก



รูปที่ 3 สมมติฐานที่ 1 สำหรับการนำเสนอแอนติเจนเฉพาะเจาะจงและการกระตุ้นที-ลิมโฟซัยท์ในไลเคนพลานัส สังเกตว่าแอนติเจนชนิดที่ 1 (Ag1) และแอนติเจนชนิดที่ 2 (Ag2) อาจจะเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ก็ได้ ดัดแปลงมาจาก Sugerman และคณะ[23]

Figure 3 The first hypothesis for specific antigen presentation and T-lymphocyte activation in lichen planus. Note that Ag1 and Ag2 may or may not be identical. Modified from Sugerman et al.[23]

สกัดออกมาจากรอยโรคเป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนซัยท์ในหลอดทดลอง และโมเลกุลที่แสดงบนเยื่อบุผิวของที-ลิมโฟซัยท์ในชั้นเยื่อบุผิวตรงบริเวณรอยโรคก็เป็นชนิดที่ยังไม่เคยได้ถูกกระตุ้น (naïve) จากแอนติเจนเลย[22] ดังนั้นคำถามจึงเกิดขึ้นว่าเซลล์ที่ยังไม่เคยถูกกระตุ้นจำนวนมากนี้มาจากไหน และมีบทบาทอย่างไรในพยาธิกำเนิดของไลเคนพลานัส จึงเป็นที่มาของสมมติฐานที่สองคือกลไกการเกิดโรคแบบไม่เฉพาะเจาะจงและไม่เกี่ยวข้องกับแอนติเจน

สมมติฐานที่ 2 กลไกการเกิดโรคแบบไม่เฉพาะเจาะจงและไม่เกี่ยวข้องกับแอนติเจน

เบสเมนท์เมมเบรน

ลักษณะทางคลินิกที่สำคัญประการหนึ่งของไลเคนพลานัสคือการที่เบสเมนท์เมมเบรนตรงบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันฉีกขาด (รูปที่ 2B) แตกเป็นกิ่งก้าน หรือ มีการสร้างขึ้นอีกชั้น เป็นที่ทราบกันดีว่าเคอราติโนซัยท์ส่งเสริมการสร้างเบสเมนท์เมมเบรน โดยการปลดปล่อยคอลลาเจนชนิดที่ 4 (collagen type IV) และลามินิน 5 (laminin V)[23] ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์เคอราติโนซัยท์ที่ตายจากขบวนการอะพอพโตซิสไม่สามารถช่วยสร้างเบสเมนท์เมมเบรนขึ้นมา หรือในทางตรงกันข้าม เมื่อมีการฉีกขาดของเบสเมนท์เมมเบรนทำให้เซลล์เคอราติโนซัยท์ชั้นเบซัลไม่สามารถยึดติดกับสิ่งใด จึงกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิส คำถามต่อมาคือสิ่งไหนเกิดก่อนระหว่างการตายของเคอราติโนซัยท์หรือเบสเมนท์เมมเบรนฉีกขาด ลักษณะที่เป็นวงจรเช่นนี้แสดงให้เห็นถึงการที่โรคเป็นเรื้อรัง (chronicity)

แมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส (Matrix metalloproteinases; MMPs)

MMPs เป็นเอ็นไซม์โปรตีเนส (proteinase) ที่อาศัยสังกะสี (Zinc) ในการย่อยโปรตีนแมทริกซ์ภายนอกเซลล์

เช่น MMP-2 และ MMP-9 ตัดคอลลาเจนชนิดที่ 4 ในขณะที่ MMP-3 และ MMP-10 ตัดคอลลาเจนชนิดที่ 4 และลามินิน พบการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-3 ในเยื่อบุผิวบริเวณรอยโรค ในขณะที่พบ MMP-9 ถูกสร้างอย่างมากบริเวณแถบของเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ซึ่งอยู่ใต้ชั้นเยื่อบุผิว[24] นอกจากนี้ยังพบอีกว่า TNF-α สามารถกระตุ้นการสร้างและการทำงานของ MMP-9 ดังนั้นเป็นไปได้ว่าระดับ TNF-α ที่เพิ่มขึ้นในรอยโรคไลเคนพลานัสจะกระตุ้นการทำงานของ MMP-9 ทำให้เกิดการทำลายเบสเมมท์เมมเบรน ซึ่งเป็นผลทำให้เซลล์เคอราติโนซัยท์ตาย นอกจากนี้การฉีกขาดของเบสเมมท์เมมเบรนยังทำให้ซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์ที่เป็นพิษเข้าไปทำลายเซลล์เคอราติโนซัยท์เพิ่มมากขึ้น

แมสท์เซลล์ (Mast cells)

พบจำนวนแมสท์เซลล์ในรอยโรคมากขึ้น[25] นอกจากนี้ประมาณ 60% ของจำนวนแมสท์เซลล์ที่พบในรอยโรคมีการปลดปล่อยสารที่อยู่ในแกรนูล (degranulation)[26] อาทิ TNF-α เอ็นไซม์ตายเมส (chymase) และทริพเทส (tryptase) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าแมสท์เซลล์จะมีบทบาทสำคัญในการทำลายเบสเมมท์เมมเบรน โดย TNF-α ที่ถูกหลั่งออกมากระตุ้นการทำงานของ MMP-9 และนอกจากนี้เอ็นไซม์ตายเมสยังช่วยกระตุ้นการทำงานของ MMP-9 อีกด้วย[27]

คีโมคายน์ (Chemokine)

คีโมคายน์ถูกจัดอยู่ในครอบครัวซัยโตคายน์และถูกสร้างโดยเซลล์เกือบทั้งหมดของร่างกาย ตัวอย่างเช่น เรกูเลทเต็ด ออน แอ็คติเวชั่น นอร์มัล ที-เซลล์ เอ็กซ์เพรสต์ แอนด์ ซีครีทเต็ด (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted; RANTES) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการชักนำให้ลิมโฟซัยท์ โมโนซัยท์ (monocyte) อีโอซิโนฟิล (eosinophil) และแมสท์เซลล์เคลื่อนที่ RANTES ถูกสร้างจากเซลล์หลายๆ ชนิด เช่น ที-ลิมโฟซัยท์ เซลล์เคอราติโนซัยท์จากช่องปาก แมสท์เซลล์ จากการศึกษาพบว่าที-ลิมโฟซัยท์ที่ถูกสกัดจากรอยโรคมีการแสดงออกของ RANTES และนอกจากนี้ TNF-α ยังกระตุ้นให้หลั่ง RANTES เพิ่มขึ้นจากที-ลิมโฟซัยท์[28] ดังนั้นเป็นไปได้ว่า RANTES ที่หลั่งออกมาจากที-ลิมโฟซัยท์บริเวณรอยโรคจะเหนี่ยวนำให้แมสท์เซลล์มีการเคลื่อนที่เข้ามาสู่รอยโรค และกระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยสารที่อยู่ภายในแกรนูลของแมสท์เซลล์ ได้แก่ TNF-α ซึ่งก็จะกระตุ้นการสร้างและหลั่ง RANTES อีกที ซึ่งกลไกที่กระตุ้นกันไปมานี้จะทำให้โรคไลเคนพลานัสเกิดขึ้นอย่างเรื้อรัง นอกจากที่ RANTES จะช่วยในการเหนี่ยวนำและการปลดปล่อยสารจากแกรนูลของแมสท์เซลล์แล้ว RANTES ยังช่วยให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบมีชีวิตยืนยาวขึ้นทำให้โรคเป็นเรื้อรังมากขึ้น

สรุปสมมติฐานที่ 2 กลไกการเกิดโรคแบบไม่เฉพาะเจาะจงและไม่เกี่ยวข้องกับชนิดของแอนติเจน

สมมติฐานนี้ประกอบไปด้วย 1. การทำลายเบสเมมท์เมมเบรนโดย MMP-9 ทำให้ 2. เซลล์เคอราติโนซัยท์ตายแบบอะพอพโตซิส 3. มีการเคลื่อนที่ของซีดีแปดที-ลิมโฟซัยท์เข้าไปทำลายเซลล์เคอราติโนซัยท์มากขึ้น 4. MMP-9 ที่สร้างมาจากที-ลิมโฟซัยท์ถูกกระตุ้นให้ทำงานมากขึ้นโดยเอ็นไซม์ตายเมสจากแมสท์เซลล์ 5. แมสท์เซลล์ถูกชักนำให้เคลื่อนเข้ามาในรอยโรคและปล่อยสารจากแกรนูลโดย RANTES จากที-ลิมโฟซัยท์ 6. ซึ่งหนึ่งในสารที่ถูกปลดปล่อยออกมาได้แก่ TNF-α ที่ทำให้เกิดการสร้าง RANTES มากขึ้นหรือกระตุ้นการเคลื่อนที่ของที-ลิมโฟซัยท์จากเส้นเลือดเข้าสู่รอยโรคมากขึ้น สมมติฐานนี้กล่าวถึงเฉพาะที-ลิมโฟซัยท์ที่ไม่เฉพาะเจาะจงหรือยังไม่เคยถูกกระตุ้นโดยแอนติเจนใดๆเลย ซึ่งพบได้ในรอยโรค ดังนั้นที-ลิมโฟซัยท์ที่ไม่เฉพาะเจาะจงนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคโดยการสร้าง MMP-9 และ RANTES

การตายของเซลล์เคอราติโนซัยท์แบบอะพอพโตซิสในรอยโรค

จากที่กล่าวมาข้างต้นการตายของเซลล์เคอราติโนซัยท์แบบอะพอพโตซิสเป็นผลลัพธ์สุดท้ายของการเกิดพยาธิสภาพ ไม่ว่ารอยโรคจะเริ่มเกิดเนื่องจากการรับรู้แอนติเจนของไลเคนพลานัสโดยที-ลิมโฟซัยท์ (ตามสมมติฐานที่ 1) หรือเริ่มจากการที่แมสท์เซลล์ปลดปล่อยสารในแกรนูลทำให้เกิดการกระตุ้นที-ลิมโฟซัยท์และการทำลายเบสเมมท์เมมเบรนด้วยเอ็นไซม์ MMP-9 จนทำให้ที-ลิมโฟซัยท์

รูปที่ 4 การปรากฏของรูปแบบที่ถูกกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์คาสเปส-3 (ลูกศรในภาพ A) และรูปแบบที่ถูกตัดของโพลี (เอดีพี-ไรโบส)โพลีเมอเรส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอ็นไซม์คาสเปส-3 (หัวลูกศรในภาพ B) ในเซลล์เคอราติโนซัยท์ของไลเคนพลานัส สิ่งเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเกิดการตายของเซลล์เคอราติโนซัยท์ในไลเคนพลานัสแบบอะพอพโตซิส ขยายจากขนาดดั้งเดิม 10 เท่า

Figure 4 The presence of activated form of caspase-3 (arrows in panel A) and cleaved form of poly (ADP-ribose) polymerase, which is a substrate of caspase-3 (arrowheads in panel B), in keratinocytes of lichen planus. These demonstrate that keratinocytes in lichen planus undergo apoptotic cell death. Original magnification 10X.

รูปที่ 5 ไม่พบการทำลายสารพันธุกรรมออกเป็นท่อนๆ ในไลเคนพลานัส (A) ในขณะที่พบว่ามีการติดสีในนิวเคลียสของเซลล์เคอราติโนซัยท์จากชิ้นเนื้อไลเคนพลานัสเดียวกัน (หัวลูกศรในภาพ B) หลังจากที่ใช้เอ็นไซม์ดีเอ็นเอสัวนย่อยสารพันธุกรรม เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลบวกในระหว่างขั้นตอนของการทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์ที่เรียกว่าอินซัยตู ทันเนิล ขยายจากขนาดดั้งเดิม 10 เท่า

Figure 5 DNA fragmentation in lichen planus was not found (A), while nuclear staining was found in keratinocytes from the same lichen planus specimen (arrowheads in panel B) after DNase I was used to digest DNA in order to be a positive control during the experimental steps of an in situ TUNEL assay. Original magnification 10X.

เข้าไปทำลายเซลล์เคอราติโนซัยท์ (ตามสมมติฐานที่ 2) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเหตุการณ์เริ่มต้นของพยาธิกำเนิดของไลเคนพลานัสในผู้ป่วยแต่ละคนจะมีความแตกต่างกันไป เนื่องจากผู้เขียนมีความสนใจในขบวนการอะพอพโตซิสที่เกิดขึ้นในไลเคนพลานัสนี้ ผู้เขียนจึงได้ทำการศึกษาโดยการย้อมชิ้นเนื้อที่ได้จากรอยโรคไลเคนพลานัส และพบว่ามีการแสดงออกที่มากขึ้นของเอ็นไซม์คาสเปส (caspase) ในรูปแบบที่ถูกกระตุ้นการทำงาน (activated form) ในนิวเคลียส (nuclear staining) ของเซลล์เคอราติโนซัยท์ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้หนึ่งของการเกิดอะพอพโตซิส (รูปที่ 4A) เมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อบุผิวปกติ นอกจากนี้หนึ่งในสารตั้งต้น (substrate) ของเอ็นไซม์คาสเปสที่ถูกกระตุ้นการทำงาน ซึ่งได้แก่ โพลี (เอดีพี-ไรโบส)โพลีเมอเรส [Poly (ADP-ribose) polymerase; PARP] ถูกตัด (cleaved) ในเซลล์เคอราติโนซัยท์ (ชั้นเยื่อบุผิว) จากรอยโรคไลเคนพลานัส (รูปที่ 4B) เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่พบสารตั้งต้นที่ถูกตัดนี้ในเซลล์เคอราติโนซัยท์จากเยื่อบุผิวปกติ ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแท้ที่จริงแล้วเกิดการกระตุ้นเอ็นไซม์คาสเปส และการทำงานของเอ็นไซม์นี้จริงๆ ในรอยโรคไลเคนพลานัส ซึ่งจะนำไปสู่ขบวนการอะพอพโตซิสในที่สุด ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถตรวจพบการทำลายสารพันธุกรรมออกเป็นท่อนๆ (DNA fragmentation) ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งของการเกิดขบวนการอะพอพโตซิสก็ตาม (รูปที่ 5A) ผลการศึกษานี้ตรงกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาที่แสดงว่าไม่จำเป็นต้องเกิดการทำลายสารพันธุกรรมออกเป็นท่อนๆ ในขบวนการเกิดอะพอพโตซิสทุกครั้งเสมอไป[28,29]

บทสรุป

พยาธิกำเนิดของไลเคนพลานัสอาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกต่างๆ ที่ถูกอธิบายด้วยสมมติฐานทั้งสองตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น แต่ก็ยังไม่มีใครทราบถึง เหตุการณ์เริ่มต้นของการเกิดไลเคนพลานัส สาเหตุหรือชนิดของแอนติเจนหรือปัจจัยที่ทำให้ผู้ป่วยคนใดคนหนึ่งเสี่ยงต่อการเป็นไลเคนพลานัสมากขึ้น ดังนั้นยังมีคำถามมากมายที่เกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของไลเคนพลานัสซึ่งกำลังรอคำตอบอยู่ อาทิ แอนติเจนที่ทำให้เกิดไลเคนพลานัสคืออะไร สำคัญเหตุการณ์ในการเกิดไลเคนพลานัสเป็นอย่างไร กลไกไหนที่กระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์เคอราติโนซัยท์ ปัจจัยอะไรที่ทำให้ผู้ป่วยเสี่ยงต่อการเป็นไลเคนพลานัสมากขึ้น เป็นต้น คำตอบหรือความรู้ที่ได้จากการค้นคว้า

วิจัยนี้จะมีความสำคัญอย่างมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในคลินิกเพื่อหาวิธีใหม่ๆ หรือสารใหม่ๆ ในการรักษาโลเคนพลานัสต่อไปในอนาคต นอกเหนือจากการใช้ยาสเตียรอยด์ (steroid) ที่ใช้รักษาโรคไลเคนพลานัสในปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อ. ดร. ทพญ. สาครรัตน์ คงชุนเทียน ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการเขียนบทความนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณทุนสนับสนุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) หมายเลข TRG4580028 ประจำปี พ.ศ. 2545 ที่สนับสนุนการตีพิมพ์บทความนี้และงานวิจัยบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

1. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The pathogenesis or oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 351-367.
2. Chainani-Wu N, Silverman SJr, Lozada-Nur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc* 2001; 132: 901-909.
3. Axéll T, Rundqvist L. Oral lichen planus- a demographic study. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15: 52-56.
4. Eisen D. The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus. Oral Surg *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88:431-436.
5. Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. *J Cutan Pathol* 2001; 28:72-82.
6. Haapalainen T, Oksala O, Kallioinen M, Oikarinen A, Larjava H, Salo T. Destruction of the epithelial anchoring system in lichen planus. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 100-103.
7. Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 86-122.
8. Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M. Auto-cytotoxic T cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* 2000; 142:449-456.
9. Yamamoto T, Osaki T, Yoneda K, Ueta E. Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994; 23:309-315.
10. Yamamoto T, Osaki T. Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 1995; 104:784-788.
11. Holmstrup P, Dabelsteen E. Changes in carbohydrate expression of lichen planus affected oral epithelial cell membrane. *J Invest Dermatol* 1979; 73:364-367.
12. Spetz AL, Strominger J, Groh-Spies V. T cell subsets in normal human epidermis. *Am J Pathol* 1996; 149:665-74.
13. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19:568-574.
14. Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ, Seymour GJ. Heat shock protein expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1995; 24:1-8.
15. Chaiyarit P, Kafrawy AH, Miles DA, Zunt SL, Van Dis ML, Gregory RL. Oral lichen planus: an immunohistochemical study of heat shock proteins (HSPs) and cytokeratins (CKs) and a unifying hypothesis of pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 1999; 28:210-215.
16. Abiko Y, Jinbu Y, Noguchi Y, Nishimura M, Kusano K, Amaratunga P, et al. Upregulation of human beta-defensin 2 peptide expression in oral lichen planus, leukoplakia and candidiasis: an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 2002; 198:537-542.
17. Sugerman PB, Savage NW, Seymour GJ, Walsh LJ. Is there a role for tumor necrosis factor alpha (TNF-

วิจัยนี้จะมีความสำคัญอย่างมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในคลินิกเพื่อหาวิธีใหม่ๆ หรือสารใหม่ๆ ในการรักษาไลเคนพลานัสต่อไปในอนาคต นอกเหนือจากการใช้ยาสเตียรอยด์ (steroid) ที่ใช้รักษาโรคไลเคนพลานัสในปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อ. ดร. ทพญ. สาครรัตน์ คงขุนเทียน ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการเขียนบทความนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณทุนสนับสนุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) หมายเลข TRG4580028 ประจำปี พ.ศ. 2545 ที่สนับสนุนการตีพิมพ์บทความนี้และงานวิจัยบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

1. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The pathogenesis or oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 351-367.
2. Chainani-Wu N, Silverman SJr, Lozada-Nur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc* 2001; 132: 901-909.
3. Axéll T, Rundqvist L. Oral lichen planus- a demographic study. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15: 52-56.
4. Eisen D. The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus. Oral Surg *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88:431-436.
5. Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. *J Cutan Pathol* 2001; 28:72-82.
6. Haapalainen T, Oksala O, Kallioinen M, Oikarinen A, Larjava H, Salo T. Destruction of the epithelial anchoring system in lichen planus. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 100-103.
7. Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 86-122.
8. Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M. Auto-cytotoxic T cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* 2000; 142:449-456.
9. Yamamoto T, Osaki T, Yoneda K, Ueta E. Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994; 23:309-315.
10. Yamamoto T, Osaki T. Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 1995; 104:784-788.
11. Holmstrup P, Dabelsteen E. Changes in carbohydrate expression of lichen planus affected oral epithelial cell membrane. *J Invest Dermatol* 1979; 73:364-367.
12. Spetz AL, Strominger J, Groh-Spies V. T cell subsets in normal human epidermis. *Am J Pathol* 1996; 149:665-74.
13. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19:568-574.
14. Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ, Seymour GJ. Heat shock protein expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1995; 24:1-8.
15. Chaiyarit P, Kafrawy AH, Miles DA, Zunt SL, Van Dis ML, Gregory RL. Oral lichen planus: an immunohistochemical study of heat shock proteins (HSPs) and cytokeratins (CKs) and a unifying hypothesis of pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 1999; 28:210-215.
16. Abiko Y, Jinbu Y, Noguchi Y, Nishimura M, Kusano K, Amaratunga P, et al. Upregulation of human beta-defensin 2 peptide expression in oral lichen planus, leukoplakia and candidiasis: an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 2002; 198:537-542.
17. Sugerman PB, Savage NW, Seymour GJ, Walsh LJ. Is there a role for tumor necrosis factor alpha (TNF-