



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การแสดงออกของแอนติไมโครเบียลเปปไทด์เบต้า-ดีเฟนซินในรอยโรค
ไลเคนพลาเนียสในช่องปาก

Expression of Antimicrobial Peptide β -Defensins in Oral Lichen Planus

โดย ดร.ทพ. สุกฤษชัย กฤษณะประกรกิจ และคณะ

เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547

สัญญาเลขที่ TRG4580028

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแสดงออกของแอนติไมโครเบียลเปปไทด์เบต้า-ดีเฟนซินในรอยโรค
ไลเคนพลาเนียสในช่องปาก

Expression of Antimicrobial Peptide β -Defensins in Oral Lichen Planus

คณะผู้วิจัย

1. อ. ดร. ทพ. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ
2. ผศ. ทพ. สุรวุฒิ พงษ์ศิริเวทย์
3. อ. ทพ. พีรณัฐ กันตะบุตร
4. Prof. Dr. Beverly A. Dale-Crunk
5. Prof. Dr. Tomas Ganz

สังกัด

คณะทันตแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่
คณะทันตแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่
คณะทันตแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่
School of Dentistry, University of
Washington, Seattle, WA, USA
Department of Medicine, UCLA,
Los Angeles, CA, USA

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

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

ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้ร่วมงานในโครงการวิจัยนี้ ได้แก่ ผศ. ทพ. สุรวุฒิ พงษ์ศิริเวทย์ ภาควิชาทันตวิทยา-พยาธิวิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยเหลือข้าพเจ้าอย่างตลอดทั้งโครงการในการตัดและอ่านผลชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่มารับการรักษาคีลิกริมฝีปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และอาสาสมัครหรือผู้ป่วยที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในโครงการวิจัยนี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณทองคำ ตายะ คุณวิมลรัตน์ กิตติกำพร และคุณลักขณา เอี่ยมเหล็ง สำหรับความช่วยเหลือทางด้านเทคนิคต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการทำวิจัย อาทิ Immunohistochemistry การถ่ายภาพด้วยเครื่องวีดิทัศน์ นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่สำหรับการทดลอง โดยเฉพาะประธานและกรรมการศูนย์เครื่องมือฯ ทุกท่าน ที่อนุญาตให้ข้าพเจ้าได้ทำการวิจัยที่ศูนย์ฯ แห่งนี้จนเสร็จสิ้นและบรรลุตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ด้วยดี

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

สุทธิชัย กฤษณะประกกรกิจ

Project Code (รหัสโครงการ) TRG4580028

Project Title (ชื่อโครงการ) การแสดงออกของแอนติไมโครเปปไทด์เบต้า-ดีเฟนซินในรอยโรคไลเคนแพลานัสในช่องปาก

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

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

Project Period (ระยะเวลาโครงการ) 2 ปี

Abstract (บทคัดย่อ)

แอนติไมโครเปปไทด์เบต้า-ดีเฟนซินเป็นส่วนประกอบหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด ซึ่งออกฤทธิ์ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดลองหลายชนิดและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง ผลการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผิวและขบวนการอักเสบ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ 2 ข้อ 1. เพื่อศึกษาถึงบทบาทของแคลเซียมต่อการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในหลอดทดลอง เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าแคลเซียมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผิวและ 2. เพื่อศึกษาถึงความเกี่ยวข้องของเบต้า-ดีเฟนซินกับขบวนการอักเสบ โดยศึกษาการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในรอยโรคไลเคนแพลานัส ซึ่งเป็นโรคเรื้อรังของเยื่อบุผิวและผิวหนังที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ วิธีการทดลอง ประกอบด้วยการศึกษาการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอสำหรับเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสามชนิดคือ เบต้า-ดีเฟนซิน-วัน -ทู และ-ทรี ในเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากที่ถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้นของแคลเซียมที่สูงขึ้นทั้งภายนอกและในเซลล์โดยวิธีรีเวอร์ส ทรานสคริปเทส โพลีเมอเรสเชน รีแอคชัน การแสดงออกในระดับโปรตีนโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ การศึกษาการแสดงออกของ เบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และ-ทู ในไลเคนแพลานัสเทียบกับเยื่อบุผิวปกติที่ปกคลุมเนื้อเยื่อโพรงปากโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินและอะพอพโตซิส ผลการทดลอง อาร์เอ็นเอสำหรับวันและโปรตีนของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นโดยความเข้มข้นแคลเซียมที่สูงขึ้นทั้งภายนอกและภายในเซลล์ การเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูถูกยับยั้งอย่างสิ้นเชิงโดยเบต้า-เอเอ็ม ซึ่งจับกับแคลเซียมภายในเซลล์ การแสดงออกของ เบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และ -ทูเพิ่มขึ้นในไลเคนแพลานัสเมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อบุผิวปกติและอยู่ใกล้กับตำแหน่งสายราแคนติตา พบการทำลายเบสเมทิลเมเบรนและเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ในเยื่อบุผิวของไลเคนแพลานัส ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเบต้า-ดีเฟนซินและขบวนการตายของเซลล์เยื่อบุผิวแบบอะพอพโตซิส และถูกยับยั้งโดยการแสดงออกของเอ็นไซม์คาสเปส-ทรี ในรูปแบบที่ถูกกระตุ้นการทำงาน และโพลี (เอดีพี-ไรโบส) โพลีเมอเรสในรูปแบบที่ถูกตัด ถึงแม้ว่าไม่พบการแตกของสารพันธุกรรมออกเป็นฟอนในรอยโรคไลเคนแพลานัส สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง แคลเซียมเป็นโมเลกุลที่สำคัญในการถ่ายทอดสัญญาณในเซลล์ที่ควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู นอกจากนี้เบต้า-ดีเฟนซินแสดงออกเพิ่มขึ้นในไลเคนแพลานัสซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ และสัมพันธ์กับขบวนการอะพอพโตซิสของเซลล์

เยื้อบุผิว ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต เป็นที่น่าสนใจว่าแท้จริงแล้วการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในหลอดทดลองผ่านทางโมเลกุลต่างที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอะพอโทซิสโดยอาศัยแคลเซียมเป็นสื่อหรือไม่

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 (ไลเคนพลาเนียส), apoptosis (อะพอโทซิส)

บทนำ

บทบาทของเซลล์เยื่อบุผิวในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด

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

แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีประจุบวก

จนถึงปัจจุบันมีแอนติไมโครเบียลเปปไทด์มากกว่าหนึ่งร้อยชนิดที่พบในพืช แมลง ปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Diamond and Bevins, 1998) ดังนั้นจึงเป็นที่ปรากฏว่าแอนติไมโครเบียลเปปไทด์มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ และเป็นกลไกระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดซึ่งมีวิวัฒนาการมานานแล้ว โครงสร้างของแอนติไมโครเบียลเปปไทด์มีความหลากหลายมาก แต่จะมีลักษณะที่สำคัญเหมือนๆ กันอยู่ 2 ประการ (Hancock, 1997) คือมีประจุรวมเป็นบวกเนื่องจากพบกรดอะมิโนที่มีประจุบวกอยู่จำนวนมากในโมเลกุล ได้แก่อาร์จินีน และไลซีน และเปปไทด์เหล่านี้ประกอบด้วยทั้งส่วนที่มีขั้ว (ชอบน้ำ) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (กลัวน้ำ) ภายในโมเลกุล หรือเรียกโมเลกุลชนิดนี้ว่า amphipathic ดังนั้นเปปไทด์เหล่านี้จึงสามารถแทรกเข้าไปอยู่ในเยื่อบุผิวของเชื้อแบคทีเรียได้ ทำให้เกิดรูขึ้นบนเยื่อบุผิว และทำให้เยื่อบุผิวไม่สามารถกันสารต่างๆ ได้และแบคทีเรียเสียชีวิตและตายในที่สุด กลไกนี้ถูกเรียกว่า self-promoted uptake ซึ่งเป็นวิธีการที่แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ใช้ทำลายเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา โดยเฉพาะแคนดิดา การที่แอนติไมโครเบียลเปปไทด์มีประจุรวมเป็นบวกมากๆ ทำให้เปปไทด์เหล่านี้ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเยื่อบุผิวแบคทีเรีย ซึ่งมีไขมันที่มีประจุลบจำนวนมาก โดยที่ปราศจากไขมันที่มีประจุบวกและคลอเลสเตอรอล ซึ่งไม่เหมือนกับเยื่อบุผิวเซลล์มนุษย์ ดังนั้นเปปไทด์เหล่านี้จึงทำลายเฉพาะเซลล์แบคทีเรีย แต่ไม่ทำลายเซลล์ของมนุษย์

ในปัจจุบันนี้แอนติไมโครเบียลเปปไทด์เป็นที่สนใจของนักวิจัยจากบริษัทยาหลายแห่งเนื่องจากปัญหาของการดื้อยาต่อยาปฏิชีวนะซึ่งกำลังเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ มีการนำเปปไทด์เหล่านี้มาใช้เป็นยาฆ่าเชื้อโรคเนื่องจากฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิดในหลอดทดลอง ได้แก่เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ และเชื้อรา ในปัจจุบันได้มีการทดลองใช้เปปไทด์เหล่านี้ในการรักษาการติดเชื้อต่างๆ ในคลินิก (clinical trials) เช่น IB367 (Intrabiotic, Inc.) ในการรักษาเฉพาะที่บริเวณเยื่อเมือกอักเสบในช่องปาก (oral mucositis) อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนถ่ายไขกระดูกที่ต้องมีการใช้ยาที่กดภูมิคุ้มกันร่วมด้วย นอกจากนี้ยังมี Mycoprex (Xoma) ซึ่งใช้ในการรักษาการติดเชื้อราแคนดิดาทางระบบโดยใช้ร่วมกับ fluconazole เพื่อเสริมฤทธิ์กัน ดังนั้นการใช้แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ทั้งในรูปแบบที่ได้จากธรรมชาติหรืออนุพันธ์ของมัน จะเป็นตัวยาใหม่ที่

สำคัญในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อในช่องปาก ซึ่งรวมถึงโรคปริทันต์อักเสบ โรคติดเชื้อรา แคนดิดา และ ผิวเยื่อเมือกในช่องปากอักเสบ ต่อไปในอนาคต

อัลฟา- และเบต้า-ดีเฟนซิน

ดีเฟนซินเป็นครอบครัวของแอนติไมโครเบียลเปปไทด์ขนาดใหญ่ที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลเป็น anti-parallel β -sheet พบดีเฟนซินครั้งแรกในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกละอองของกระต่าย (Patterson-Delafield *et al.*, 1980; Selsted *et al.*, 1983) และต่อมาพบในเซลล์ชนิดอื่นๆ ด้วย ซึ่งรวมถึงเซลล์เยื่อบุผิว ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถแบ่งดีเฟนซินออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ อัลฟา- และเบต้า-ดีเฟนซิน ถึงแม้ว่าดีเฟนซินทั้งสองกลุ่มนี้จะมี ความแตกต่างในลำดับของกรดอะมิโนพอสมควร แต่ก็มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันบางประการ ได้แก่ มี โครงสร้างโมเลกุลเป็น anti-parallel β -sheet เหมือนกัน มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อโรคพอๆ กัน และ ยีนที่กำหนดการสร้างอัลฟา- และเบต้า-ดีเฟนซิน อยู่ใกล้ๆ กันบนโครโมโซมเดียวกันทั้งในจีโนม ของมนุษย์และหนู ซึ่งแสดงให้เห็นถึงว่ายีนสองยีนนี้มีวิวัฒนาการร่วมกัน

อัลฟา-ดีเฟนซินถูกสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลและแมคโครฟาจของมนุษย์ กระต่าย หนู ซึ่งมีความยาวของกรดอะมิโนตั้งแต่ 29 ถึง 36 ตัว และประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีน 6 ตัวเสมอ (รูปที่ 1) ซิสเทอีนทั้ง 6 ตัวจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะทำให้เกิด โครงสร้างของ anti-parallel β -sheet ที่มีเสถียรภาพ (Kagan *et al.*, 1994) พบอัลฟา-ดีเฟนซิน จำนวนมากและประกอบเป็นร้อยละ 5-10 ของโปรตีนทั้งหมดที่สกัดจากเซลล์นิวโทรฟิล (Lehrer *et al.*, 1993) ถึงแม้ว่าเบต้า-ดีเฟนซินจะมีรูปร่างคล้ายกับอัลฟา-ดีเฟนซิน แต่เบต้า-ดีเฟนซินแตกต่าง จากอัลฟา-ดีเฟนซินตรงตำแหน่งของกรดอะมิโนซิสเทอีนทั้ง 6 ตัวและการจับคู่กันของซิสเทอีนทั้ง 6 ตัว รูปที่ 1 และ 2 เปรียบเทียบตำแหน่งของกรดอะมิโนซิสเทอีน

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.

HNP-1	A	C	Y	C	R	I	P	A	C	I	A	G	E	R	R	Y	G	T	C	I	Y	Q	G	R	L	W	A	F	C	C
HNP-2		C	Y	C	R	I	P	A	C	I	A	G	E	R	R	Y	G	T	C	I	Y	Q	G	R	L	W	A	F	C	C
HNP-3	D	C	Y	C	R	I	P	A	C	I	A	G	E	R	R	Y	G	T	C	I	Y	Q	G	R	L	W	A	F	C	C
HNP-4	Y	C	S	C	R	L	V	F	C	R	R	T	E	L	R	V	G	N	C	L	I	G	G	V	S	F	T	Y	C	C
HD-5		C	Y	C	R	T	G	R	C	A	T	R	F	S	L	S	G	V	C	E	I	S	G	R	L	Y	R	L	C	C
HD-6		C	H	C	R	R		S	C	Y	S	T	E	Y	S	Y	G	T	C	T	V	M	G	I	N	H	R	F	C	C
Consensus		C	-	C	R	-	-	-	C	-	-	-	E	-	-	-	G	-	C	-	-	-	G	-	-	-	-	C	C	-
disulfide bonds		①		②					③									④										⑤	⑥	

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.

hBD-1	DHYN	C	V	S	S	G	G	Q	C	L	Y	S	A	C	P	I	F	T	K	I	Q	GT	C	Y	R	G	K	A	K	C	C	K	
hBD-2	GIGDPV	C	L	K	S	G	A	I	C	H	P	V	F	C	P	R	Y	K	Q	I	GT	C	G	L	P	G	T	K	C	C	K	K	
mBD-1	YK	C	L	Q	H	G	G	R	C	L	R	S	S	C	P	S	N	T	K	L	Q	GT	C	K	P	D	K	P	N	C	C	K	
TAP	NPVS	C	V	R	N	K	G	I	C	V	P	I	I	C	P	G	S	M	K	Q	I	GT	C	V	G	R	A	V	K	C	C	R	K
LAP	RNSQS	C	R	R	N	K	G	I	C	V	P	I	I	C	P	G	S	M	R	Q	I	GT	C	L	G	A	Q	V	K	C	C	R	R
BNBD-12	GPLS	C	G	R	N	G	G	V	C	I	P	I	I	C	P	V	P	M	R	Q	I	GT	C	F	G	R	P	V	K	C	C	R	S
Consensus		C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	C	P	-	-	-	-	-	GT	C	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	
disulfide bonds		●							●					●								●							●	●			

สมาชิกตัวแรกของเบต้า-ดีเฟนซินคือ tracheal antimicrobial peptide (TAP) ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกโดย Diamond และคณะในปี 1991 ในเซลล์คอลลิมนาร์วของเซลล์เยื่อบุผิวหลอดลมของวัว 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 คับอ่อน ไต ค่อม น้ำลาย ค่อมลูกหมาก 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 และประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีนจำนวน 6 ตัว ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมือนกันในครอบครัวเบต้า-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-วันในเซลล์เคอราติโนไซต์ชั้นซูปราเบซัลของผิวหนัง เยื่อบุผิวเหงือก (Fulton *et al.*, 1997; Dale *et al.*, 2001) เบต้า-ดีเฟนซิน-ทูถูกสกัดจากผิวหนังที่เป็นโรคเรื้อนทวาร (psoriasis) (Harder *et al.*, 1997) และในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและเนื้อเยื่อในช่องปาก (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในเซลล์เยื่อบุผิวของปอดส่วนต้น ในลำไส้เล็กและใหญ่ ในคับอ่อน ในเต้านม และในเยื่อบุผิวช่องปาก (Bals *et al.*, 1998b; Dale *et al.*, 2001) พบว่าในขณะที่เบต้า-ดีเฟนซิน-วันแสดงออกแบบ constitutive เบต้า-ดีเฟนซิน-ทู แสดงออกน้อยมากในผิวหนังปกติ แต่จะ

ถูกกระตุ้นให้แสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์เคอราติโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวก เชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ และสารก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น ทุเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา (Harder et al., 1997) นอกจากนี้การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นด้วยสารสกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อ *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) ซัยโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและ phorbol ester (PMA) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวที่มีฤทธิ์มาก (Krisanaprakornkit et al., 2000) เมื่อไม่นานนี้ทั้งเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู เปปไทด์ถูกสกัดพบได้จากอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวที่ถูกเพาะเลี้ยงและของเหลวช่องเหงือก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ทั้งสองตัวนี้ถูกสร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์จริงๆ (Diamond et al., 2001) ถึงแม้ว่าเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู คล้ายคลึงกับเบต้า-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) อาร์เอ็นเอรหัสของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทรีถูกกระตุ้นให้แสดงออกเพิ่มขึ้นโดยทุเมอร์เนคโครซิสแฟคเตอร์-อัลฟา และเชื้อแบคทีเรียในเซลล์เคอราติโนไซต์เพาะเลี้ยงและเซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินหายใจ แสดงให้เห็นว่าเบต้า-ดีเฟนซิน-ทรีมีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด บริเวณเยื่อบุผิวหนังและที่ปอด การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน ของมนุษย์ในบริเวณชั้นเยื่อบุผิวของหลายๆ อวัยวะ และที่ผิวหนังแสดงให้เห็นถึงบทบาทของเปปไทด์เหล่านี้ในการป้องกันเชื้อโรค พบว่าโรคซิสติก ไฟโบรซิส (cystic fibrosis) เป็นโรคแรกที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับความผิดปกติในการทำงานของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และ เบต้า-ดีเฟนซิน-ทู (Goldman et al., 1997; Bals et al., 1998b) เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นบริเวณทางเดินหายใจของผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้อาจไปยับยั้งการทำงานของเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์ ซึ่งทำให้ผู้ป่วยที่เป็นซิสติก ไฟโบรซิสมีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สูงขึ้นมาก ความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยเป็นผลมาจากความผิดปกติที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมของ cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) transporter

บทบาทของเบต้า-ดีเฟนซินของมนุษย์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและได้รับภายหลัง นอกจากบทบาทของเบต้า-ดีเฟนซินในการทำลายเชื้อโรคแล้ว พบว่าเบต้า-ดีเฟนซินยังมีฤทธิ์ในการชักนำเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเข้ามา หรือที่เรียกว่า คีโมแทคติก (chemotactic) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงหน้าที่ใหม่ของเบต้า-ดีเฟนซิน โดยเป็นตัวเชื่อมต่อการระหว่างระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและที่ได้รับภายหลัง พบว่าเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์สามารถชักนำเซลล์เดนดริติก และกระตุ้นการเคลื่อนที่ของ memory CD45RO/CD4 ที-ลิมโฟไซต์ (Yang et al., 2001; Yang et al., 1999) นอกจากนี้เบต้า-ดีเฟนซิน-ทูยังกระตุ้นการสร้างพรอสตาแกลนดิน ดีทูและการปลดปล่อยฮิสตามีนจากแมสต์เซลล์อย่างมาก (Niyonsaba et al., 2001) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของเปปไทด์

เหล่านี้ในขบวนการอักเสบ จึงเห็นได้ว่าเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์มีส่วนร่วมในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งสองระบบ

บทบาทของแคลเซียมในการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน

หลายๆ การศึกษาแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินและการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์เยื่อบุผิว เช่น ตำแหน่งของอาร์เอ็นเอรหัสของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในเซลล์เคอราติโนไซต์ชั้นซูปราเบซัล (Fullton *et al.*, 1997; Dale *et al.*, 2001) นอกจากนี้พบเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูแสดงออกมากขึ้นในเซลล์เคอราติโนไซต์ของผิวหนังที่มีขนาดเซลล์ใหญ่และมีการเปลี่ยนแปลงไปแล้ว (Liu *et al.*, 2002) ตำแหน่งของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเปปไทด์อยู่ในชั้นบนๆ ของเยื่อบุผิว ซึ่งจะสอดคล้องกับบทบาทของเปปไทด์เหล่านี้ในการทำหน้าที่เป็นด่านต่อต้านเชื้อโรค (Ali *et al.*, 2001; Dale *et al.*, 2001) แคลเซียมมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผิว เซลล์เคอราติโนไซต์ที่เลี้ยงในความเข้มข้นต่ำของแคลเซียมจะแบ่งตัว แต่เมื่อเปลี่ยนไปเลี้ยงในความเข้มข้นของแคลเซียมที่สูงขึ้น เซลล์เคอราติโนไซต์จะหยุดการแบ่งตัวและมีการแสดงออกของตัวบ่งชี้ของการเปลี่ยนแปลง เช่น อินโวลูคริน เคอราตินชนิดที่ 1 และ 10 ลอวูคริน และโปรไฟล์แลกกริน (Yuspa *et al.*, 1989) แคลเซียมยังกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ทรานสกลูตามิเนส ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างคอร์นีไฟด์ เอนเวลอพ (Polakowska and Goldsmith, 1991; Missero *et al.*, 1996) บทบาทของแคลเซียมในการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อเห็นได้ชัดจากการปรากฏของ calcium gradient ในผิวหนังคือระดับของแคลเซียมเพิ่มขึ้นจากชั้นเบซัลไปจนถึงชั้นแกรนูล่า (Menon and Elias, 1991) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินซึ่งมีความสัมพันธ์กับขบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ จะถูกควบคุมโดยแคลเซียมซึ่งควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ในการศึกษาที่ทางคณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าแคลเซียมน่าจะเป็นโมเลกุลที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในหลอดทดลอง

ความเกี่ยวข้องของเบต้า-ดีเฟนซินในโรคไลเคนพลาเนีย

โรคไลเคนพลาเนียเป็นโรคที่เกิดขึ้นบริเวณผิวเยื่อเมือกและผิวหนังที่พบได้ค่อนข้างบ่อยประมาณตั้งแต่ร้อยละ 0.1 จนถึง 4 ขึ้นอยู่กับประชากรที่ศึกษา (Scully *et al.*, 1998) ไลเคนพลาเนียเป็นโรคที่พบในวัยกลางคนจนถึงคนสูงอายุ และพบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย 2 เท่า (Sklavounou and Laskaris, 1983) ลักษณะทางคลินิกของไลเคนพลาเนียประกอบด้วย ลายเส้นสีขาวซึ่งมักจะเป็นทั้งสองข้าง โดยพบมากที่สุดที่เยื่อกระพุ้งแก้มด้านหลัง (ประมาณร้อยละ 90 ของรอยโรคทั้งหมด) บนลิ้น (ประมาณร้อยละ 30) และบนสันเหงือกหรือเหงือก (ประมาณร้อยละ 13) ลักษณะรอยโรคชนิดผื่นลิ้นหรือเป็นแผลจะทำให้ผู้ป่วยรู้สึกปวดแสบปวดร้อน (Thorn *et al.*, 1988) และเป็นอาการนำที่ทำให้ผู้ป่วยมาพบทันตแพทย์ โดยพบประมาณร้อยละ 43 ถึง 91 ของผู้ป่วยที่เป็นไลเคนพลาเนียทั้งหมด (Scully *et al.*, 1998) นอกจากนี้มักจะพบว่ามีการติดเชื้อราแคนดิดาบริเวณรอยโรคร่วม

ด้วยเสมอ โดยเฉพาะรอยโรคชนิดผ่อลิบหรือเป็นแผล (Hatchuel *et al.*, 1990) มีรายงานบ่งชี้ว่างานพบว่าโรคไลเคนพลาณีสสามารถเปลี่ยนไปเป็นมะเร็งช่องปากชนิดสแควมัสเซลล์คาร์ซิโนมาได้ โดยพบประมาณร้อยละ 0.4 ถึง 3.3 ขึ้นอยู่กับการศึกษา (Scully *et al.*, 1998) และพบว่าไลเคนพลาณีสชนิดผ่อลิบหรือเป็นแผลดลอกที่บริเวณลิ้นและเหงือกมักจะเป็นตำแหน่งที่เสี่ยงต่อการเปลี่ยนไปเป็นโรคมะเร็งมากที่สุด (Barnard *et al.*, 1993) ดังนั้นการเฝ้าระวังและติดตามโรคไลเคนพลาณีสจึงเป็นสิ่งสำคัญ

พยาธิกำเนิดของไลเคนพลาณีสยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่น่าจะมาจากหลายปัจจัยร่วมกัน คือปัจจัยที่มาจากผู้ป่วยเองและปัจจัยสิ่งแวดล้อม สำหรับปัจจัยที่มาจากผู้ป่วยคาดว่าน่าจะเกิดจากความผิดปกติของกลไกของระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เป็นสื่อโดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวที-ลิมโฟซัยท์ ที่ทำลายเบสเมมเบรนที่กั้นระหว่างเยื่อผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันให้ขาดออกและนอกจากนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที-ลิมโฟซัยท์ยังเข้าไปทำลายเซลล์เยื่อผิวให้ตายด้วยกระบวนการอะพอพโตซิส (Sugerman *et al.*, 2002) โดยมีสาเหตุทั้งจากภายในและภายนอกอื่นๆ ร่วมด้วย แต่ถึงอย่างไรก็ตามปัจจัยที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคไลเคนพลาณีสก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Walsh *et al.*, 1990) และนอกจากนี้กลไกในการเกิดโรคที่แน่ชัดก็ยังไม่ชัดเจน นอกจากจะมีสมมติฐานที่ถูกตั้งขึ้นมาเพื่อใช้อธิบายเท่านั้น (Sugerman *et al.*, 2002) เป็นไปได้ว่ามีสารจากภายนอก หรือยา หรือเชื้อโรคมากระตุ้นเซลล์เยื่อผิว ทำให้เซลล์เยื่อผิวสร้างซัยโตคายน์ มีการนำเสนอสิ่งแปลกปลอมเนืบนโมเลกุล เอ็มเอชซี คลาสทู มีการสร้างและปลดปล่อยสารต่างๆ จำนวนมากเช่นเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและยังมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์เดนตริติกและที-ลิมโฟซัยท์ให้เข้ามาอยู่ตรงรอยโรค (Yang *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์ในรอยโรคไลเคนพลาณีสซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ และนอกจากนี้อาจเป็นไปได้ที่เบต้า-ดีเฟนซินที่แสดงออกเพิ่มขึ้นมีส่วนร่วมในพยาธิกำเนิดของไลเคนพลาณีสด้วย ในการศึกษาทางคณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่ามีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ในรอยโรคไลเคนพลาณีส และน่าจะอยู่ใกล้กับบริเวณที่มีการติดเชื้อราแคนดิดาในรอยโรค นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองตัวนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโตซิสที่เกิดขึ้นในเซลล์เยื่อผิวในรอยโรคไลเคนพลาณีสด้วย

วัสดุและวิธีการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิว

เซลล์เยื่อบุผิวช่องปากถูกแยกออกมาจากเนื้อเยื่อเหงือกซึ่งปกคลุมฟันความสูงที่สาม (Krisanaprakornkit *et al.*, 1998) ซึ่งขั้นตอนในการนำเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยมาทดลองได้ผ่านคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิและสวัสดิภาพของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เซลล์เยื่อบุผิวถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชื่อ keratinocyte growth medium (Bohannon Inc., Walkersville, MD, USA) ซึ่งประกอบด้วยความเข้มข้นต่ำของแคลเซียม (0.03 mM) หลังจากเซลล์แบ่งตัวเกือบเต็มจานเพาะเลี้ยง (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 µM ในการกระตุ้นเซลล์ก่อนที่จะกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นดังกล่าวข้างต้น 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-ดีเฟนซินอาร์เอ็นเอ นำรหัส ไออาร์เอ็นเอประมาณ 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 แสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการขยายสารพันธุกรรมสำหรับเบต้า-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 *Fusobacterium nucleatum* หรือทั้งไว้โดยไม่ถูกกระตุ้น 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-ติเฟนซิน-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) ที่ติดอยู่กับกล้องฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus, Japan)

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา 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 ในพาราฟินบล็อก

เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ 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% H₂O₂ 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 ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งของกระบวนการอะพอพโตซิสในชิ้นเนื้อที่ถูกตัดลงบนสไลด์ วิธีการทำเริ่มต้นด้วยการอุ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่ 57°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจุ่มสไลด์ในไซลีน (xylene) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และแช่ในแอลกอฮอล์ 100%, 95% และ 70% ตามลำดับ ครั้งละ 5 นาที หลังจากนั้นแช่สไลด์ใน 1X PBS สองครั้งๆ ละ 5 นาที เติม proteinase K ลงบนสไลด์ประมาณ 50 μ l อบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย deionized water สองครั้งๆ ละ 2 นาที แช่สไลด์ใน Quenching solution ซึ่งประกอบด้วย เมทานอล 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 μ l 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 μ l ลงไปบนชิ้นเนื้อและอบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย 1X PBS-Tween 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที เติม 50 μ l 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) การแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของอินเตอร์ลิวคิน-8 ถูกกระตุ้นโดยความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่สูงขึ้นและ thapsigargin (รูปที่ 3A และ 3C) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจากการศึกษาโดย Yu และคณะ ปี 2001 ในเซลล์เยื่อผิวของลำไส้ใหญ่

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-ทูผ่านทางเส้นทางสัญญาณภายในเซลล์หลายๆ เส้นทาง ซึ่งก็คล้ายกับผลการทดลองโดย Krisanaprakornkit และคณะ ปี 2002 ที่พบว่าเส้นทางสัญญาณที่มีชื่อว่า mitogen activated protein kinase ทั้ง 3 เส้นทางเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู

จากการศึกษาเมื่อไม่นานนี้พบว่า lipopolysaccharide (LPS) กระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ในเซลล์เยื่อผิวทางเดินหายใจของมนุษย์โดยผ่านทาง การเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์ (Tomita *et al.*, 2002) ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษารวาระดับแคลเซียมภายในเซลล์ที่สูงขึ้นมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในเซลล์เยื่อผิวช่องปากหรือไม่ จากการศึกษาพบว่า BAPTA-AM ซึ่งเป็นสารเคมีที่สามารถจับกับแคลเซียมภายในเซลล์ สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดยสารสกัดของผนังเซลล์ของ *Fusobacterium nucleatum* หรือโดย thapsigargin หรือโดยความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่สูงขึ้นอย่างสิ้นเชิงที่ความเข้มข้นของ BAPTA-AM ที่ 30 μ M (รูปที่ 5) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นชัดว่าการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดยส่วนประกอบของแบคทีเรีย ระดับแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่สูงขึ้น และ thapsigargin ขึ้นอยู่กับการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากแหล่งที่เก็บในเซลล์

นอกจากอาร์เอ็นเอรหัสของเบต้า-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-ดีเฟนซินในไลเคนพลาเนียสในช่องปาก

จากการทดลองในหลอดทดลอง พบว่าการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน โดยเฉพาะเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในเนื้อเยื่อโดยเฉพาะในโรคลิเคนพลาเนียสที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ และพบได้ค่อนข้างบ่อยในคลินิกทันตกรรม โดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียในการศึกษาการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Tomas Ganz, UCLA สำหรับแอนติบอดีต่อเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์ทั้งสองตัวนี้ ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน (รูปที่ 7A) และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู (รูปที่ 7C) ในรอยโรคไลเคนพลาเนียส เมื่อเปรียบเทียบกับไม่พบการแสดงออกของเปปไทด์ทั้งสองตัวนี้ในเยื่อบุผิวกระพุ้งแก้มปกติที่ได้จากโรคไฟโบรมา (รูปที่ 7I และ 7J) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซินเปปไทด์ทั้งสองตัวนี้ในรอยโรคโครนิกัลเปอร်พลาสติก 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 แสดงระดับความเข้มของการติดสีย้อมบนชิ้นเนื้อจากไลเคนพลาเนียส 15 ตัวอย่าง โครนิกัลเปอร်พลาสติก แคนดิเดียซิส 5 ตัวอย่าง และไฟโบรมา 3 ตัวอย่าง

การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในตำแหน่งที่ใกล้กับสายราแคนดิดา

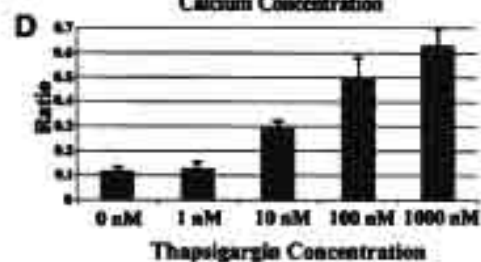
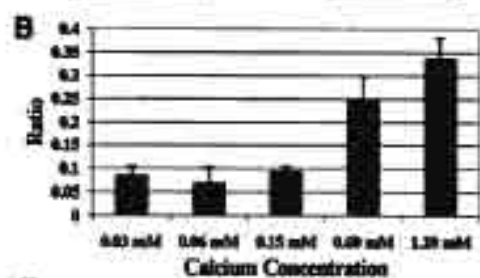
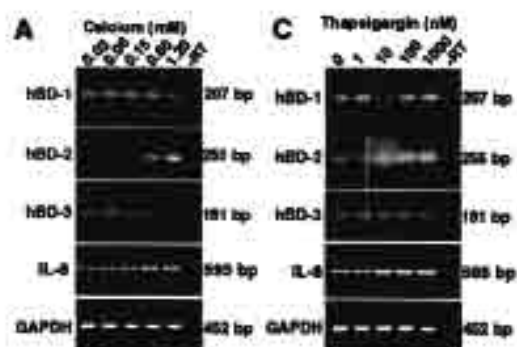
ในชิ้นเนื้อไลเคนพลาเนียสบางชิ้นพบสายราแคนดิดาซึ่งย้อมติดสีม่วงชมพูด้วยเทคนิค PAS (หัวลูกศรในรูปที่ 8C) อยู่บริเวณผิว ซึ่งใกล้กับตำแหน่งที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู (รูปที่ 8A และ 8B) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาด้วยเทคนิค imprint culture พบว่ามีการติดเชื้อราแคนดิดาตรงบริเวณรอยโรคไลเคนพลาเนียส ทั้ง 15 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค imprint culture มีความไวในการตรวจหาการติดเชื้อราบริเวณรอยโรคมากกว่าการย้อมด้วยเทคนิค PAS นอกจากนี้พบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู (รูปที่ 8D และ 8E ตามลำดับ) ในบริเวณที่ใกล้กับตำแหน่งของสายราแคนดิดาในรอยโรคโครนิกัลเปอร်พลาสติก แคนดิเดียซิส (รูปที่ 8F)

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

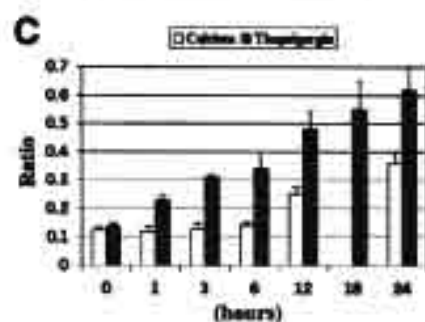
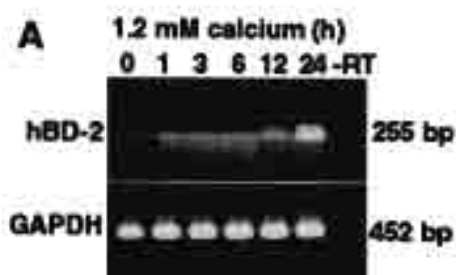
จากการย้อมหาตำแหน่งของเซลล์เม็ดเลือดขาวที-ลิมโฟซัยท์ในไลเคนพลาเนียด้วย แอนติบอดีต่อ CD45RO ซึ่งใช้ตรวจหาเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ที่ถูกกระตุ้นและเกิดความจำขึ้น (activated and memory T-lymphocyte) พบว่าเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์อยู่รวมกันเป็นแถบ (lymphocytic band) ใต้ต่อชั้นเยื่อบุผิว และยังพบว่าเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ดังกล่าวอยู่กระจัดกระจาย ภายในชั้นเยื่อบุผิวอีกด้วย (intraepithelial T-lymphocyte) (หัวลูกศรในรูปที่ 9F) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการทำลายของเบสเมนท์เมมเบรนที่ตำแหน่งเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (รูปที่ 9E) ในขณะที่เบสเมนท์เมมเบรนที่อยู่ล้อมรอบเส้นเลือดในรอยโรค ยังคงปกติอยู่ (หัวลูกศรในรูปที่ 9E) การปรากฏของเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์และการทำลายของเบสเมนท์เมมเบรนในไลเคนพลาเนียสนับสนุนสมมติฐานการเกิดพยาธิสภาพของไลเคนพลาเนีย โดยเกิดขบวนการตายของเซลล์เยื่อบุผิวแบบอะพอพโตซิสโดยเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ที่ผ่านเข้ามาในชั้นเยื่อบุผิว (Sugerman *et al.*, 2002) และยังแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ในชั้นเยื่อบุผิวของไลเคนพลาเนีย (รูปที่ 9C และ 9D ตามลำดับ) และการเกิดขบวนการตายของเซลล์เยื่อบุผิวแบบอะพอพโตซิส

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู และขบวนการอะพอพโตซิสในเซลล์เยื่อบุผิวของไลเคนพลาเนีย

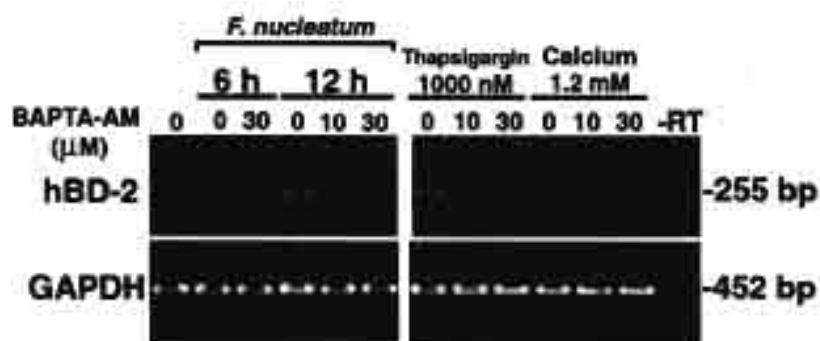
เพื่อตรวจหาความสัมพันธ์ดังกล่าว ได้ทำการย้อมหาตำแหน่งของเอนไซม์คาสเปส-ทรี ในรูปแบบที่ทำงานได้ (active form) และตำแหน่งของ โพลี(เอดีพี-ไรโบส)โพลีเมอเรส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นตัวหนึ่งของเอนไซม์คาสเปส-ทรีในรูปแบบที่ถูกตัดแล้ว ในรอยโรคไลเคนพลาเนีย จากการศึกษพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์คาสเปส-ทรีในรูปแบบที่ทำงานในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวของโรคไลเคนพลาเนีย (ลูกศรในรูปที่ 10C) และพบการแสดงออกของโพลี(เอดีพี-ไรโบส)โพลีเมอเรสในรูปแบบที่ถูกตัดในบริเวณเดียวกัน (หัวลูกศรในรูปที่ 10D) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู (รูปที่ 10A และ 10B ตามลำดับ) สัมพันธ์กับขบวนการอะพอพโตซิสที่เกิดขึ้นในเซลล์เยื่อบุผิวของไลเคนพลาเนีย ถึงแม้ว่าจะไม่พบการทำลายของสารพันธุกรรมซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ตัวหนึ่งของการเกิดอะพอพโตซิส ด้วยวิธี *in situ* TUNEL assay ในชั้นเยื่อบุผิวของทั้งไลเคนพลาเนียและโครนิคัยเปอร์พลาสติคแคนดิเดียมซิส (รูปที่ 11C และ 11G ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อเดียวกันซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ nuclease เพื่อจงใจทำให้เกิดการทำลายของสารพันธุกรรม (หัวลูกศรในรูปที่ 11D และ 11H ตามลำดับ) ซึ่งถูกใช้เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลบวกสำหรับเทคนิคนี้



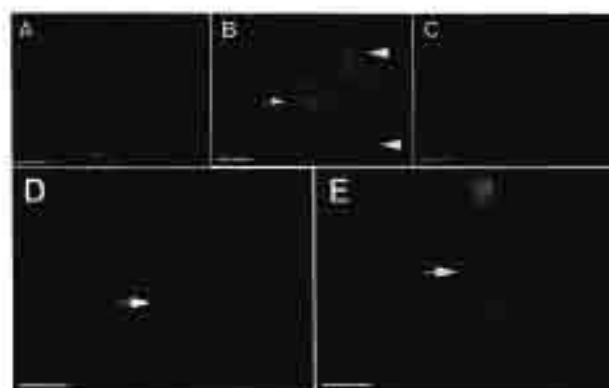
รูปที่ 3



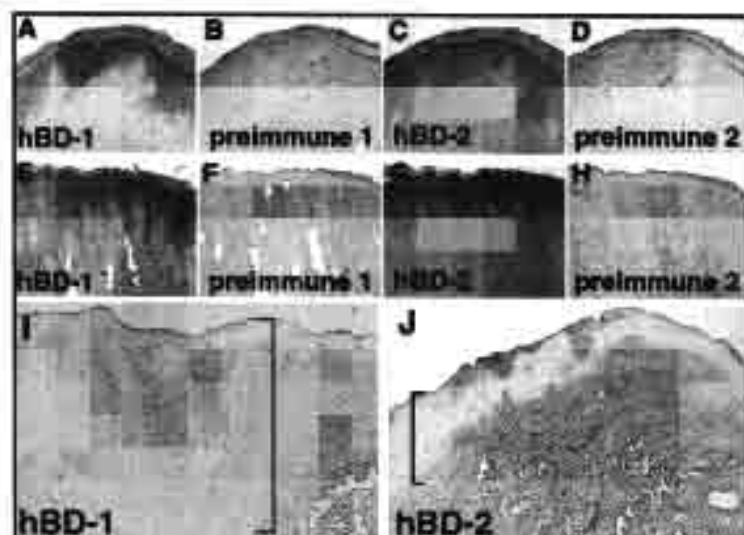
รูปที่ 4



รูปที่ 5



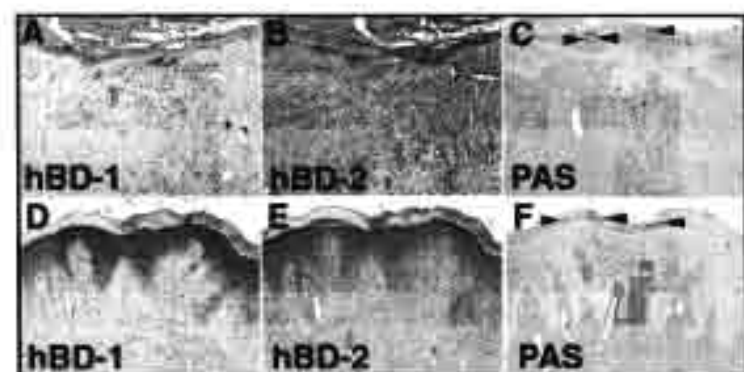
รูปที่ 6



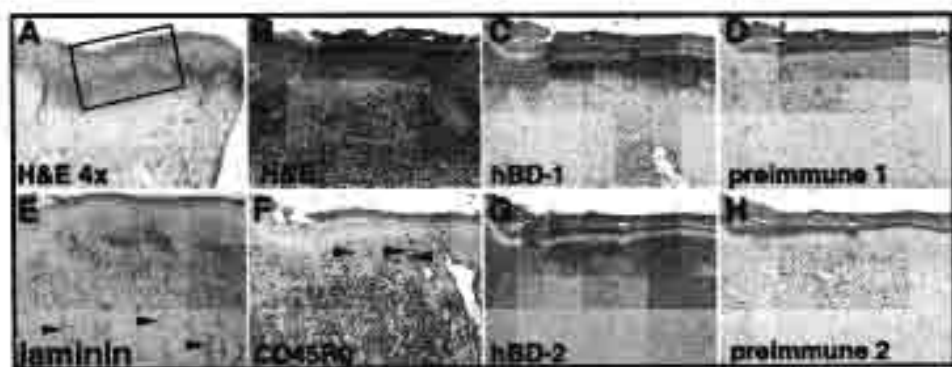
รูปที่ 7

	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

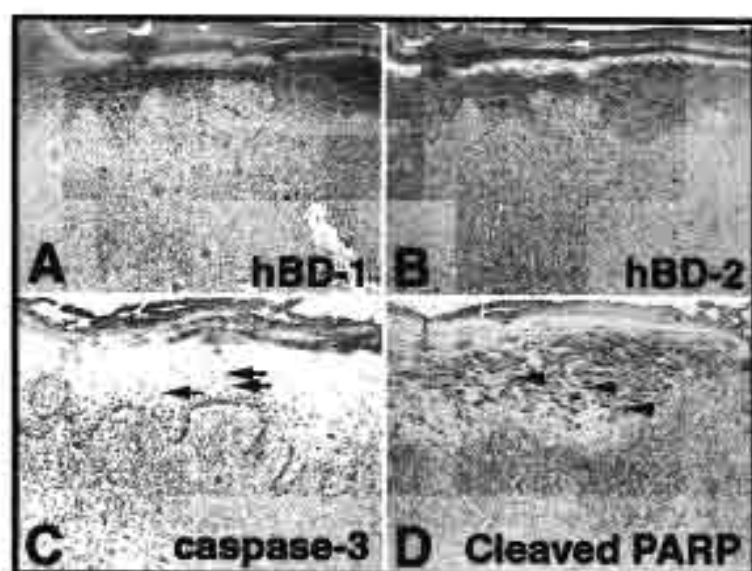
ตารางที่ 2



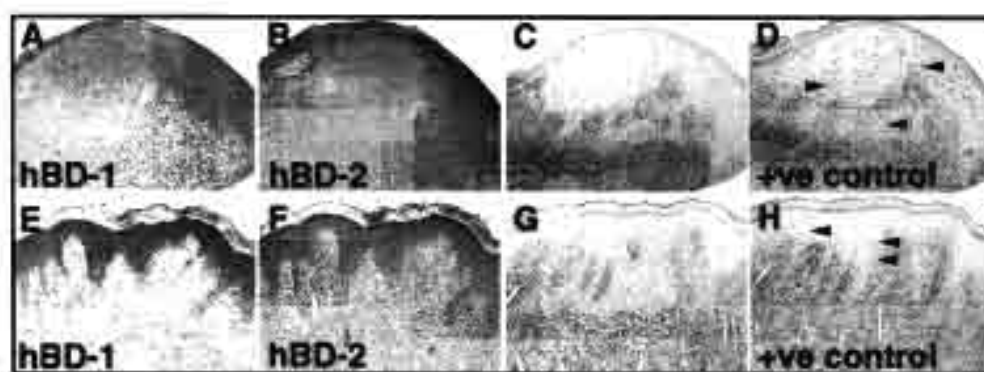
รูปที่ 8



รูปที่ 9



รูปที่ 10



รูปที่ 11

บทวิจารณ์

บทบาทของแคลเซียมต่อการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ในหลอดทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาถึงเส้นทางสื่อสัญญาณซึ่งควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน จากการศึกษาที่ผ่านมาของหัวหน้าโครงการพบการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์เยื่อบุผิวช่องปาก (Krisanaprakornkit et al., 2000; Dale et al., 2001) และการเหนี่ยวนำการสร้างเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดย *Fusobacterium nucleatum* ต้องอาศัยการกระตุ้นเส้นทางสื่อสัญญาณที่มีชื่อว่า mitogen activated protein kinase (Krisanaprakornkit et al., 2002) ในการศึกษาที่พบว่าการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในเซลล์เยื่อบุผิวยังถูกควบคุมโดยระดับแคลเซียมที่สูงขึ้นทั้งภายนอกและภายในเซลล์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับตำแหน่งของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในชั้นซูปราเบเซลล์และแกรนูลาของชั้นเยื่อบุผิว (Dale et al., 2001) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีการแสดงออกของตัวบ่งชี้สำหรับการเปลี่ยนแปลงขั้นสุดท้ายของเซลล์เยื่อบุผิว ซึ่งถูกควบคุมโดยความเข้มข้นของแคลเซียมที่เพิ่มขึ้น (Lee et al., 1992) ความเข้มข้นของแคลเซียมที่ 0.60 และ 1.20 mM ซึ่งใช้ในการกระตุ้นเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ทำให้เกิดการสร้างเยื่อบุผิวเป็นหลายๆ ชั้น (stratification) เกิดการสร้างคอร์นิไฟด์เอนเวลอพ และควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงขั้นสุดท้าย เช่น โปรไฟล์แลกกริน ทรานสกลูตามิเนส และอินโวลูคริน (Eckert et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมภายในเซลล์มีความสำคัญต่อการกระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดยแบคทีเรีย เพราะว่า BAPTA-AM สามารถยับยั้งการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูโดย *Fusobacterium nucleatum* ดังนั้นเส้นทางสื่อสัญญาณโดยอาศัยแคลเซียมเป็นสื่อในเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากเกี่ยวข้องทั้งการควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ และการพัฒนาสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดที่เยื่อบุผิวโดยการกระตุ้นการสร้างเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู

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

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

การศึกษาที่ผ่านมาพบความสัมพันธ์ระหว่างเบต้า-ดีเฟนซิน-วันเปปไทด์และการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อ ถึงแม้ว่าจะตรวจพบอาร์เอ็นเอรหัสของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันในชั้นเยื่อบุผิวซึ่งมีจำนวนหลายชิ้นมากกว่าเปปไทด์ของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน (Dale et al., 2001) แต่ถึงอย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้จากหลอดทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในเนื้อเยื่ออย่างสิ้นเชิง เนื่องจากกลไกในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผิวในเนื้อเยื่อมีความซับซ้อนมากกว่าที่ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปัจจัยเดียวซึ่งก็คือแคลเซียมที่ใช้ในการทดลองนี้จะสามารถอธิบายได้ ดังนั้นการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อขบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผิวเช่น 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 เป็นระยะเวลานานก็น่าจะมาจากการที่แคลเซียมเคลื่อนเข้าสู่เซลล์จากภายนอกเซลล์ (Tombal et al., 2002) ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Li et al., 1995) และเช่นเดียวกับการกระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-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 และต่อมาทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคล้ายกับการที่ phorbol ester ใช้เวลานานในการกระตุ้นให้เซลล์เคอราติโนไซต์เปลี่ยนแปลง (Yuspa et al., 1983) โดยสรุปทางคณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าระดับแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่สูงขึ้นและ thapsigargin สามารถกระตุ้นการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทู ซึ่งผ่านทาง การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์ และเช่นเดียวกัน *Fusobacterium nucleatum* กระตุ้นให้สร้างเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูมากขึ้นโดยผ่านทางเส้นทางการส่งสัญญาณที่ใช้แคลเซียม การศึกษากลไกที่ควบคุมการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูน่าจะช่วยทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกในการป้องกันตัวเองของ

เซลล์ ขบวนการการเกิดโรค และความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อผิวและระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด เพิ่มมากขึ้น

การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินในไลเคนพลาณัสซึ่งสัมพันธ์กับอะพอฟโตซิส

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในไลเคนพลาณัสในช่องปาก เมื่อเปรียบเทียบกับชั้นเนื้อเยื่อผิวปกติที่คลุมไฟโบรมา แสดงให้เห็นว่าเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิดเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นอย่างเรื้อรังภายในรอยโรค นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้นี้ก็สอดคล้องกับผลการทดลองของ Abiko และคณะ ปี 2002 ซึ่งพบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในไลเคนพลาณัส แต่ยังพบว่านอกจากเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูที่เพิ่มขึ้นในไลเคนพลาณัสในช่องปากแล้ว เบต้า-ดีเฟนซิน-วันก็ยังเพิ่มขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซิน-วันและเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูในบริเวณใกล้เคียงกับสายราแคนดิดา ก็ยืนยันถึงหน้าที่ในการปกป้องการติดเชื้อของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิดที่เยื่อผิว นอกจากนี้พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในไลเคนพลาณัสแล้ว ยังพบอีกว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิดในโรคโครนิก ฮีเปอร์พลาสติก แคนติเดียซิส ซึ่งก็อยู่ใกล้กับบริเวณที่พบสายราแคนดิดาอีกด้วย

ลักษณะที่พบเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ชนิดที่ถูกกระตุ้นและมีหน่วยความจำและการพบการทำลายของเบสเมนท์เมมเบรนในไลเคนพลาณัสสอดคล้องกับผลการทดลองโดย Zhou และคณะปี 2002 และยังสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่าเซลล์ที-ลิมโฟซัยท์ที่เข้าไปในชั้นเยื่อผิวจากการที่เบสเมนท์เมมเบรนถูกทำลาย ทำให้เกิดการทำลายเซลล์เยื่อผิวแบบอะพอฟโตซิส (Sugerman *et al.*, 2002) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่การเพิ่มขึ้นของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิดในรอยโรคไลเคนพลาณัสจะสัมพันธ์กับขบวนการเกิดอะพอฟโตซิสในชั้นเยื่อผิว

ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจสอบหาการแสดงออกของตัวบ่งชี้ของการเกิดอะพอฟโตซิสในไลเคนพลาณัส โดยเน้นตัวบ่งชี้สองชนิดคือ 1. ตรวจหาการแสดงออกของเอนไซม์ คาสเปส-ทรีในรูปแบบที่ทำงานได้และการแสดงออกของสารตั้งต้นที่ถูกตัดของเอนไซม์คาสเปส-ทรี ซึ่งก็คือ โพลี(เอดีพี-ไวโบส)โพลีเมอเรสในรูปแบบที่ถูกตัด เพื่อตรวจหาการแสดงออกของเอนไซม์ และตรวจสอบว่าเอนไซม์ที่แสดงออกนั้นทำหน้าที่ได้จริงๆ 2. ตรวจหาการแตกออกเป็นท่อนๆ ของสารพันธุกรรมในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อผิวในไลเคนพลาณัส ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ตัวหนึ่งของอะพอฟโตซิส ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้พบการแสดงออกของเอนไซม์คาสเปส-ทรีในรูปแบบที่ทำงานได้และยังพบการแสดงออกของโพลี(เอดีพี-ไวโบส)โพลีเมอเรสในรูปแบบที่ถูกตัดในชั้นเยื่อผิวของไลเคนพลาณัสตรงบริเวณที่มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับชั้นเยื่อผิวปกติที่คลุมเนื้อออกไฟโบรมา ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่การแสดงออกของเบต้า-ดีเฟนซินทั้งสองชนิดจะถูกควบคุมโดยโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับอะพอฟโตซิส ดังนั้นสมมติฐานนี้จึงน่าจะได้ทำการทดสอบในหลอดทดลองต่อไปในการศึกษาหน้า การติดเชื้อในช่อง

โคพลาซิม (cytoplasmic staining) ของโพลิ(เอดีพี-ไรโบส)โพลิเมอเรสซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่อยู่ในนิวเคลียสสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาใน Hep-2 cell line ซึ่งพบว่าหลังจากที่โพลิ(เอดีพี-ไรโบส)โพลิเมอเรสถูกตัดแล้ว ก็จะมีออกมานอกนิวเคลียสเข้าไปอยู่ในไซโตพลาซิมและพบในเซลล์ที่เกิดอะพอโตซิสในขั้นสุดท้ายและนอกจากนี้เซลล์พวกนี้ยังไม่เกิดการแตกของสารพันธุกรรม (Soldani *et al.*, 2001)

เป็นที่น่าประหลาดใจว่าไม่พบการแตกออกเป็นท่อนของสารพันธุกรรมในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวในไลเคนพลาเนีย ทั้งๆ ที่มีการแสดงออกของตัวบ่งชี้ตัวอื่นๆ ของกระบวนการอะพอโตซิสดังที่ได้กล่าวข้างต้น ผลการทดลองนี้ขัดกับผลจากการศึกษาที่ผ่านมาที่แสดงถึงการแตกออกเป็นท่อนของสารพันธุกรรมในไลเคนพลาเนีย (Bloor *et al.*, 1999; Neppelberg *et al.*, 2001) แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็มีรายงานการศึกษาที่ผ่านมาในเซลล์ชนิดอื่นที่ไม่พบการแตกออกเป็นท่อนของสารพันธุกรรมเกิดขึ้นในกระบวนการอะพอโตซิส (Tomei *et al.*, 1993) หรือแม้กระทั่งในเซลล์เคอราติโนไซต์จากผิวหนังมนุษย์ (Jansen *et al.*, 2003) และนอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาในเซลล์ชนิดอื่นๆ ที่พบว่าการแตกออกเป็นท่อนของสารพันธุกรรมมักจะไม่มีพบในเซลล์ที่เอ็นไซม์คาสเปส-ทรีถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ (activated form) (Badran *et al.*, 2003; Brecht *et al.*, 2001) จึงเป็นไปได้ว่าการแตกออกของสารพันธุกรรมในนิวเคลียสอาจจะไม่ใช่ตัวบ่งชี้ที่สำคัญของกระบวนการอะพอโตซิสในไลเคนพลาเนียในช่องปาก หรือการกระตุ้นการทำงานของคาสเปส-ทรีซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของอะพอโตซิสโดยปราศจากการทำลายของสารพันธุกรรม (DNA fragmentation) เป็นกระบวนการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง (dynamic degenerative process) ซึ่งยังไม่ถึงขั้นสุดท้ายที่เซลล์ถูกทำลายและตายโดยไม่หวนกลับคืน

เมื่อเร็วๆ นี้พบว่าการเกิด single nucleotide polymorphisms (SNPs) ของทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟาและอินเตอร์เฟียร์อนแกมมาทำให้เพิ่มโอกาสเสี่ยงมากขึ้นในการเกิดโรคลิเคนพลาเนียในช่องปาก (Carrozzo *et al.*, 2004) จากผลการทดลองนี้จึงเป็นไปได้ที่ว่าการเกิด single nucleotide polymorphisms ในยีนเบต้า-ดีเฟนซินทั้ง 4 ชนิดได้แก่เบต้า-ดีเฟนซิน-วัน เบต้า-ดีเฟนซิน-ทู เบต้า-ดีเฟนซิน-ทรี และเบต้า-ดีเฟนซิน-โฟร์ อาจจะทำให้บุคคลนั้นมีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นไลเคนพลาเนียเช่นเดียวกัน ที่เป็นเช่นนี้เพราะ ทางคณะผู้วิจัยคาดเดาจากผลการทดลองที่พบว่าเบต้า-ดีเฟนซิน-วัน และเบต้า-ดีเฟนซิน-ทูเพิ่มขึ้นในไลเคนพลาเนีย เช่นเดียวกับที่พบไซโตคายน์ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นในไลเคน พลาเนีย (Fayyazi *et al.*, 1999) นอกจากนั้นเบต้า-ดีเฟนซินยังสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเคลื่อนที่และการกระตุ้นของแมสท์เซลล์ (Niyonsaba *et al.*, 2002) เซลล์เตา:เคอริติกและที-ลิมโฟไซต์ (Yang *et al.*, 1999) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าทั้งแมสท์เซลล์และเซลล์ที-ลิมโฟไซต์เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของไลเคนพลาเนียโดยที่เซลล์ทั้งสองชนิดสามารถสร้างและหลั่งทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-อัลฟาและอินเตอร์เฟียร์อนแกมมา (Walsh *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2001) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาว่าจริงๆ แล้วบุคคลที่เสี่ยงต่อการเป็นไลเคนพลาเนียในช่องปาก มี SNPs เกิดขึ้นในยีนของเบต้า-ดีเฟนซินทั้ง 4 ชนิดหรือไม่เมื่อเทียบกับ SNPs ที่เกิดขึ้นในไซโตคายน์ทั้งสองชนิดดังกล่าวข้างต้น

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, Ubaldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Arduino P, Broccoletti R, Vezza D, Rendine S, Curtioni 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, Wong AV, 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 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.

Tomel 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, Seymour 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)

บทวิทยากร

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. โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นของฟัน. ว ทนต. 2546; 52: 429-38.

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

- สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ. พยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลของไลเคนพลาเนียส. 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 ของบทวิทยากร 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 ของบทวิทยากร 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 ทนต. 2546; 52: 429-38.
4. Reprint ของบทความปริทัศน์ สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ. เทคนิคทางอณูชีววิทยาสำหรับงานวิจัยทางทันตแพทยศาสตร์. ว ทนต. 2546; 53: 131-140.
5. Reprint ของบทความปริทัศน์ สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ. พยาธิกำเนิดในระดับโมเลกุลของโรคเอนเพลานัส. 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"



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

RESEARCH REPORTS

Biological

S. Krisanaprakornkit¹*, D. Jotikasthira²,
and B.A. Dale³

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

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

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'-tetra-acetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester); DMSO, dimethylsulfoxide; *F. nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum*; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HBDs, human β -defensins; HGEs, 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.

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

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 (Yung *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; Misero *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.

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

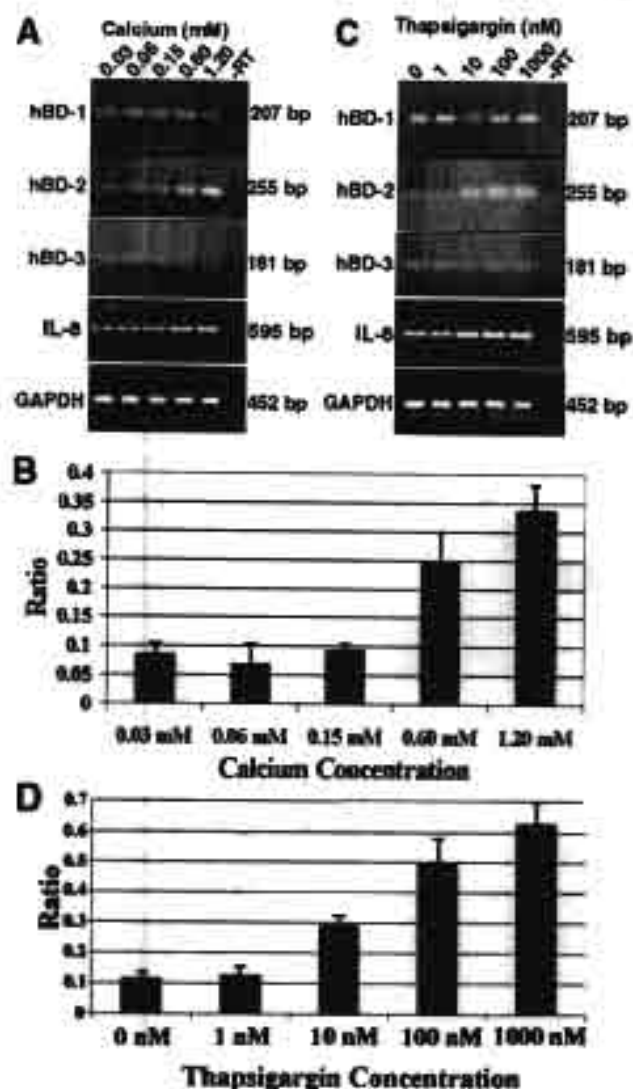


Figure 1. The effect of increased extracellular and intracellular calcium on β -defensin mRNA expression. (A) RT-PCR analysis. HGEs were incubated in various calcium concentrations (0.03, 0.06, 0.15, 0.60, or 1.20 mM) overnight. Total RNA was isolated and RT-PCR was conducted as described in MATERIALS & 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. HGEs 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

HGEs 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). HGEs were cultured in serum-free keratinocyte growth medium (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD, USA), containing low calcium (0.03 mM). After 80% confluence, HGEs were stimulated with either 10 μ g 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 μ M. 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- μ g 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 $\pm$ 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 HGEs 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. HGEs 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 HGEs, 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 HGEs 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 HGEs (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 HGEs 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 HGEs 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

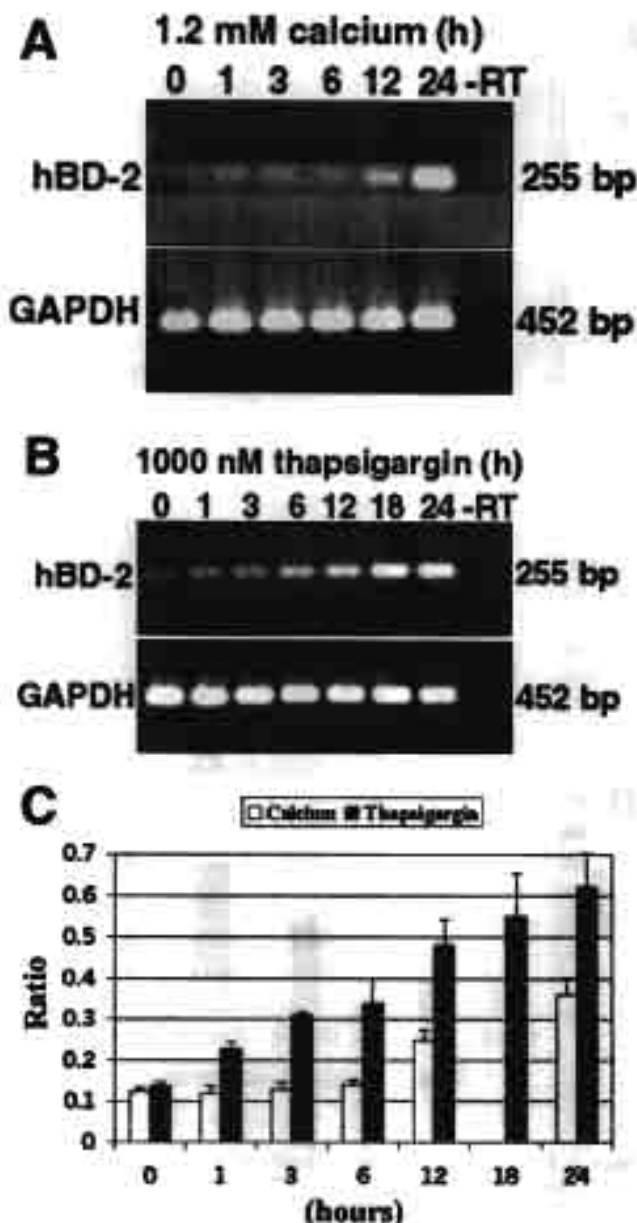


Figure 2. Kinetics of hBD-2 mRNA up-regulation by calcium and thapsigargin. HGEs were stimulated with 1.20 mM extracellular calcium (A) or 1000 nM thapsigargin (B) for the indicated times. RT-PCR analysis was performed as described in MATERIALS & METHODS. (C) Densitometric analysis of RT-PCR in panels A and B. The relative ratios of hBD-2 to GAPDH were determined as described in MATERIALS & METHODS. The y axis represents the ratio; 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 HGEs 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. HGEs were pre-incubated with 0, 10, or 30 μ M BAPTA-AM for 45 min, and then stimulated with either 10 μ g 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 μ M BAPTA-AM.

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 HGEs stimulated with 10 μ g 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 HGEs. Control unstimulated HGEs showed no immunoreactivity against hBD-2 peptide (Fig. 4A). *F. nucleatum*-stimulated HGEs 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,

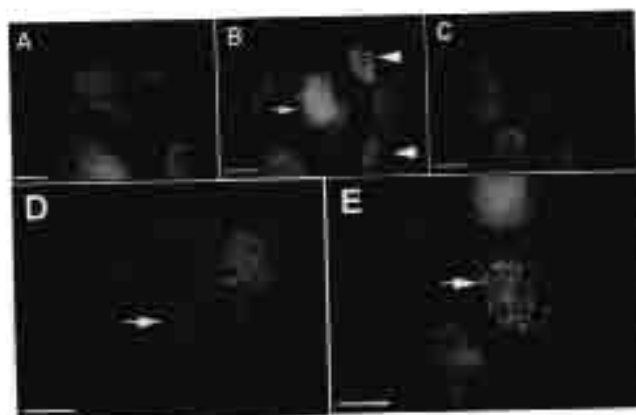


Figure 4. Localization of hBD-2 peptide in stimulated HGEs. HGEs grown on coverslips were unstimulated (A) or stimulated overnight with 10 μ g of *F. nucleatum* cell wall extract/ml (B,C), 1.20 mM extracellular calcium (D), or 1000 nM thapsigargin (E). HGEs were fixed and reacted with polyclonal antibody 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 μ m. The data shown are representative of 2 separate experiments.

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 μ M 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. Tongkam 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 Periodontol Res* 36:285-294.
- Dunche A, Acil Y, Domnich 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 RF, 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-Quang 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.
- Lin 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, Gudmiller JM, Loeb 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 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 suprananomolar 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.



**การศึกษานำร่องหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ
จุลชีพก่อโรคปริทันต์ห้าชนิดและระดับความลึกของร่องลึก
ปริทันต์**

**The pilot study of association between the quanti-
ties of five periodontopathic pathogens and the
Levels of periodontal pocket depth**

สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ
สาครรัตน์ คงขุนเทียน
ธีรวิษ ไชติพานิช
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 Krisanaprakomkit*, Sakornrat Khongkhunthian**,
Teerawich Chotipanich***, Rattana Umprivan**

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 periodontitis¹⁻³. A.a. plays a significant role in the pathogenesis of localized juvenile periodontitis as well as some forms of severe peri-

odontitis in adults⁴ 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 toxin⁹. 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 destruction⁹.

P.g. is a second intensively studied periodontal pathogen, and reportedly associates with adult and rapidly progressive periodontitis¹⁰. *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 site¹¹. *B.f.* was first described in 1979¹². It is found in higher numbers in sites of destructive periodontal disease than in gingivitis or healthy sites¹³. In addition, *B.f.* is detected more frequently and in higher numbers in active periodontal lesions than inactive lesions¹⁴. 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 plaque¹⁷. 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 periodontitis¹⁸. 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 μ l 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 lyse bacterial cells, and 20 μ l 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 MgCl₂ (Invitrogen), 1 µl 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	
Itx (forward)	TTT CTC CAT ATT AAA TCT OCT TGT	495 for high*
Itx (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.L. (forward)	TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG	585
P.L. (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 leukotoxin gene operon, which is a characteristic of the high toxicity clone of A.a. *

** A 1,025-bp PCR product is the low toxicity clone of A.a. *