**Thesis Title** Effects of *Enterococcus faecalis* on Matrix Metalloproteinase-2 Expression and Activation in Cultured Fibroblasts from Human Periodontal Ligament

**Author** Ms. Nattawan Tantawiwat

**Degree** Master of Science (Dentistry)

**Thesis Advisory Committee**

| | |
|---|---|
| Asst. Prof. Dr. Kassara Pattamapun | Chairperson |
| Assoc. Prof. Dr. Suttichai Krisanaprakornkit | Member |
| Dr. Saengusa Khemaleelakul | Member |

# ABSTRACT

Apical periodontitis is an inflammatory process in the periradicular tissues caused by microorganisms in the root canal. Bacterial products induce the cells to secrete high levels of several cytokines and proteases that degrade extracellular matrix, resulting in periradicular tissue destruction. Most degradation of the extracellular matrix is performed by matrix metalloproteinases. *Enterococcus faecalis*, a Gram-positive bacterium, is the most frequently identified species in canals of endodontically failed teeth with periradicular lesions.

The purpose of this study was to determine the effects of *Enterococcus faecalis* on MMP-2 expression and activation in cultured fibroblasts from human periodontal ligament. The results were evaluated by gelatin zymography to detect the activation of MMP-2. The reverse transcription polymerase chain reaction

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

was used to investigate the expression of MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA. The western blot analysis was used to investigate the expression of respective protein.

The gelatin zymography revealed that *Enterococcus faecalis* supernatant and heat-killed *Enterococcus faecalis* induced MMP-2 expression and activated MMP-2 in a dose dependent fashion. *Enterococcus faecalis* supernatant increased MMP-2 and TIMP-2 mRNA expression, whereas MT1-MMP expression was not altered. Using western blot analysis, this study showed that *Enterococcus faecalis* supernatant stimulated secretion of TIMP-2, but not MT1-MMP. These findings suggest that *Enterococcus faecalis* supernatant may regulate MMP-2 activity through TIMP-2. Heat-killed *Enterococcus faecalis* up-regulated MMP-2 expression and activated MMP-2, whereas it decreased TIMP-2 protein level. These observations suggest that heat-killed *Enterococcus faecalis* can activate MMP-2 in cultured fibroblasts, similar to the activation of MMP-2 by *Enterococcus faecalis* supernatant, but by different mechanisms.

In summary, these results demonstrated that *Enterococcus faecalis* can induce MMP-2 expression and activation in cultured fibroblasts from human periodontal ligament. It is possible that *Enterococcus faecalis*, found in canals of endodontically failed teeth with periradicular lesions, may participate in extracellular matrix degradation by up-regulation of MMP-2 expression and activation of MMP-2 during periradicular inflammation.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** ผลของเชื้อ อเอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสต่อการแสดงออกและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส -2 ในเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์

**ผู้เขียน** นางสาว ฉัฐวรรณ ตัณฑวิวัฒน์

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ทันตแพทยศาสตร์)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

ผศ.ทพญ.ดร.เกษรา ปัทมพันธุ์ ประธานกรรมการ

รศ.ทพ.ดร.สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ กรรมการ

อ.ทพญ.ดร.แสงอุษา เขมาลีลากุล กรรมการ

## บทคัดย่อ

ภาวะการอักเสบของเนื้อเยื่อปริทันต์รอบปลายรากเกิดจากปฏิกิริยาการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบรากฟันที่มีสาเหตุจากจุลชีพในคลองรากฟัน ผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียเหนี่ยวนำให้เซลล์ร่างกายมนุษย์หลั่งไซโตไคน์และเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในปริมาณที่สูง มีผลให้เกิดการทำลายสารที่อยู่ระหว่างเซลล์มากขึ้น ก่อให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์รอบปลายรากฟัน การทำลายสารที่อยู่ระหว่างเซลล์ส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส เชื้อ เอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส เป็นเชื้อแกรมบวกที่พบบ่อยที่สุดในฟันที่ได้รับการรักษาคลองรากฟันแล้วล้มเหลวโดยมีรอยโรครอบปลายรากฟัน

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของ เชื้อเอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสต่อการแสดงออกและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสทูในเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์ ทำการวิเคราะห์ผลในส่วนของการกระตุ้นการทำงาน ของเอ็มเอ็มพีทูด้วยวิธีเจลาติน ไซโมกราฟี เทคนิครีเวิร์สทรานสคริปชั่น โพลีเมอเรสเชน รีแอกชั่นใช้ในการวิเคราะห์การ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แสดงออกของยีนเอ็มเอ็มพีทู เอ็มทีวันเอ็มเอ็มพีและทิมทู ในระดับอาร์เอ็นเอนำรหัส ส่วน เวสเทิร์นบอร์ทใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกในระดับโปรตีน

ผลจากเจลาติน ไซโมกราฟี พบว่า สารหลั่งจากเชื้อ เอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสและเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนสามารถเหนี่ยวนำการสร้างเอ็มเอ็มพีทูและกระตุ้นการทำงานของเอ็มเอ็มพีทูโดยเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารที่ใช้กระตุ้น สารหลั่งจากเชื้อ เอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสสามารถกระตุ้นการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของเอ็มเอ็มพีทู และทิมทูเพิ่มขึ้น ส่วนเอ็มทีวัน-เอ็มเอ็มพีไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในการวิเคราะห์ด้วย วิธีเวสเทิร์นบอร์ท พบว่า สารหลั่งจากเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสกระตุ้นการหลั่งทิมทูเพิ่มขึ้นในขณะที่เอ็มทีวัน-เอ็มเอ็มพีไม่มีการเปลี่ยนแปลง นั่นคือ การกระตุ้นการทำงานของเอ็มเอ็มพีทูโดยสารหลั่ง จากเชื้อ เอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสอาจเกิดจากผลของทิมทูที่เพิ่มขึ้น ส่วนการกระตุ้นด้วยเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสที่ถูกฆ่าด้วยความร้อน พบว่า การแสดงออกของเอ็มเอ็มพีทูและการกระตุ้นการทำงานของเอ็มเอ็มพีทูเพิ่มขึ้น ในขณะที่พบ การลดลงของการแสดงออกของทิมทูในระดับโปรตีน จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า เชื้อเอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนสามารถกระตุ้นการทำงานของเอ็มเอ็มพีทูได้เช่นเดียวกับ สารหลั่งจากเชื้อ เอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสแต่มีความแตกต่างของกลไกในการกระตุ้น

สรุป การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อเอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอ็มเอ็มพีทูในเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์เพิ่มขึ้น รวมถึงสามารถกระตุ้นการทำงานของเอ็มเอ็มพีทู จึงเป็นไปได้ว่า เชื้อเอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคาลิสซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยในฟันที่ได้รับการรักษาคลองรากฟันแล้วล้มเหลวและมีรอยโรครอบรากฟัน อาจมีส่วนในการทำลายสารที่อยู่ระหว่างเซลล์ในภาวะที่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อปริทันต์รอบปลายรากฟัน ในส่วนของการเพิ่มการแสดงออกและกระตุ้นการทำงานของเอ็มเอ็มพีทู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved