Thesis Title Expression and Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in Human Gingival Fibroblasts and Gingival Epithelial Cells

Author Ms. PattaninMontreekachon

Degree Doctor of Philosophy (Dentistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc.Prof. Dr.SuttichaiKrisanaprakornkit	Advisor
Asst.Prof. Dr. KassaraPattamapun	Co-advisor
Assoc.Prof. Dr. PrachyaKongtawelert	Co-advisor

ABSTRACT

Matrix metalloproteinase (MMP) -2 and -9,have been implicated in several pathological conditions in the oral cavity. Particularly, the raised levels of MMP-2 and MMP-9 in gingival crevicular fluid have shown to be associated with the increased severity of periodontitis. Some previous studies have demonstrated that human gingival fibroblasts (HGFs) and human gingival epithelial cells (HGECs) are resident periodontal cells to mainly produce MMP-2 and MMP-9, respectively. Moreover, some studies have shown the critical role of phospholipase D (PLD) and phospholipase A_2 (PLA_2) as signaling molecules to regulate MMP-2 and MMP-9 expression in other cell types and tumor cell lines.Therefore, the objectives of this study were to determine the expression and activity of MMP-2 and MMP-9 in HGFsand in HGECs upon stimulation with *Fusobacteriumnucleatum* (*F. nucleatum*) cell wall extract,phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA), or interleukin-1β, and to elucidate the signaling molecules involved in up-regulation of these two MMPs.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

It was demonstrated that MMP-2 mRNAwas constitutively expressed in HGFs and HGECs, while the expression and activity of MMP-2 protein were increased with prolonged incubation times even in the absence of stimulants in HGFs, suggesting the stability and a possible auto-activation mechanism of MMP-2 protein. By contrast, PMA considerably induced MMP-9expression and activity in HGECs, whereas*F. nucleatum*cell wall extract did so moderately.The time-course study demonstrated that MMP-9 mRNA up-regulation was found at 3 hours of stimulation, whereas MMP-9 secretion and activity in cell-free culture supernatants occurred later at 12 hours of stimulation.

PLD1$\alpha$and PLD1β mRNA expression were constitutively expressed in HGECs; however,PLD2 mRNA was up-regulated by all doses of PMA tested. Both*F. nucleatum*cell wall extract and PMA induced PLD activity, resulting phosphatidic acid production.Pretreatment HGECs with 1% (vol/vol) of ethanol and of 1-butanol, PLD inhibitors, or withvarying doses of propranolol, a phosphatidic acid phosphatase inhibitor, significantly inhibited MMP-9 expression and activity induced by both stimulants ($P<0.05$). Furthermore, dioctanoylphosphatidic acid and dioctanoylglycerolcould up-regulate MMP-9 mRNA expression and activity even in the absence of stimulants, confirming the importance of PLD in MMP-9 up-regulation.

Subsequently, it was found that the expression of cPLA$_2\alpha$ was constitutive and the transient activation of cPLA$_2$ by Ser505phosphorylation was observed in the HGEC nuclei upon stimulation with *F. nucleatum* cell wall extract and PMA. Induction of MMP-9 expression andactivity was significantly inhibited by 1 μM of thespecific cPLA$_2\alpha$ inhibitor ($P<0.01$). In conclusion, the MMP-2 expression and activity are not induced by the stimulants tested in this study in both HGFs and HGECs,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

whereasactivation of both PLD and$cPLA_2\alpha$is critical for induction of MMP-9 expression and activity in HGECs in response to the periodontal bacterium, *F. nucleatum*, and PMA, indicating that PLD and $cPLA_2\alpha$ act as the important signaling molecules for MMP-9 up-regulation. Based on all of these findings from this study, targeted inhibition of either PLD, $cPLA_2\alpha$, or both may be therapeutically beneficial for the management of oral mucosal inflammatory disease, whose pathogenesis is involved in increased MMP-9 production, such as, periodontal disease, oral lichen planus, etc.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแสดงออกและการควบคุมเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-2 และ -9 ในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของมนุษย์

ผู้เขียน นางสาวพัทนินทร์ มนตรีขจร

ปริญญา ทันตแพทยศาสตรดุษฎีบัณฑิต

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ทพ.ดร. สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ.ทพญ.ดร. เกษรา ปัทมพันธุ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส -2 และ -9 มีความเกี่ยวข้องกับโรคหลายชนิดในช่องปาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งระดับของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส -2 และ -9 ในน้ำเหลืองเหงือกที่เพิ่มขึ้นนั้นสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบที่รุนแรงขึ้น การศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่า เซลล์สร้างเส้นใยและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกนั้นเป็นเซลล์ในอวัยวะปริทันต์ที่ผลิตเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส -2 และ -9 ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น มีการศึกษาที่แสดงถึงบทบาทของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดี และฟอสโฟไลเปสเอทู ว่าเป็นโมเลกุลที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ เอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส -2 และ -9 ในเซลล์อื่นๆ รวมถึงเซลล์มะเร็ง ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อดูการแสดงออกและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส -2 และ -9 ในเซลล์สร้างเส้นใยและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกเมื่อถูกกระตุ้นด้วย สารสกัดจากผนังเซลล์ของฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม หรือสารเคมี (พีเอ็มเอ) หรือ อินเตอร์ลิวคิน-1เบตา และเพื่อแสดงถึงโมเลกุลสื่อสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนสทั้งสองชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการศึกษาพบว่าระดับของอาร์เอนเอนำรหัสของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-2 นั้นมีการแสดงออกที่คงที่ทั้งในเซลล์สร้างเส้นใยและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก ขณะที่การแสดงออกของโปรตีนและการกระตุ้นการทำงานนั้นเพิ่มขึ้นตามเวลาแม้ไม่มีตัวกระตุ้นก็ตาม ชี้ให้เห็นถึงความเสถียรและอาจเกิดจากกลไกการกระตุ้นตัวเองของโปรตีนเอง ในทางตรงข้าม พีเอ็มเอ นั้นกระตุ้นการแสดงออกและกระตุ้นการทำงานของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส -9 ในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกอย่างมาก ส่วนสารสกัดจากผนังเซลล์ของฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม นั้นกระตุ้นในระดับปานกลาง การศึกษาตามเวลาพบการแสดงออกของอาร์เอนเอนำรหัสของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-9 หลังการกระตุ้น 3 ชั่วโมง ขณะที่พบการหลั่งออกไปนอกเซลล์และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-9 หลังการกระตุ้น 12 ชั่วโมง

พบการแสดงออกของอาร์เอนเอนำรหัสของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดีวัน แอลฟา และเบตา ที่คงที่ในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก อย่างไรก็ตามพบการเพิ่มขึ้นของอาร์เอนเอนำรหัสของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดีทูเมื่อกระตุ้นด้วยพีเอ็มเอ ทั้งสารสกัดจากผนังเซลล์ของฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม และพีเอ็มเอ ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดี และเกิดการสร้างกรดฟอสฟาทิดิก เมื่อใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 หรือโพรพาโนลอลซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ฟอสฟาทิดิกแอซิด ฟอสฟาเตส หลาย ๆ ความเข้มข้นกระตุ้นเซลล์ก่อน พบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของอาร์เอนเอนำรหัสและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-9 ที่ถูกกระตุ้นโดยสารสกัดจากผนังเซลล์ของฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม และพีเอ็มเอ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ยิ่งไปกว่านั้น ไดออกทาโนอิล ฟอสฟาทิดิก แอซิด และไดออกทาโนอิล กลีเซอรอล สามารถกระตุ้นการแสดงออกของอาร์เอนเอนำรหัสและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-9 แม้ไม่มีตัวกระตุ้นก็ตาม ซึ่งผลการศึกษานี้ยืนยันความสำคัญของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดีในการกระตุ้นเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-9

และยังพบว่าเอนไซม์ไซโตโซลิค ฟอสโฟไลเปสเอทูแอลฟา มีการแสดงออกของอาร์เอนเอนำรหัสที่คงที่แต่พบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนชั่วคราวโดยปฏิกิริยาการเติมฟอสเฟตที่ซีรีนตำแหน่งที่ 505 ในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดจากผนังเซลล์ของฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม และพีเอ็มเอ สารยับยั้งของเอนไซม์ไซโตโซลิค ฟอสโฟไลเปสเอทูแอลฟา ที่ความเข้มข้น 1 ไม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โครโมลาร์มีผลในการยับยั้งการกระตุ้นการแสดงออกและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01) สรุป การแสดงออกและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-2 ในเซลล์สร้างเส้นใยและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกไม่ถูกกระตุ้นโดยตัวกระตุ้นใด ๆ ในการศึกษานี้ ในขณะที่การกระตุ้นเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดี และ เอนไซม์ไซโตโซลิค ฟอสโฟไลเปสเอทูแอลฟานั้นมีบทบาทสำคัญต่อการกระตุ้นการแสดงออกและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-9 ในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก ในการตอบสนองต่อจุลชีพทางปริทันต์ เช่น ฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม หรือสารเคมี เช่น พีเอ็มเอ ชี้ให้เห็นว่า เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดี และ เอนไซม์ไซโตโซลิค ฟอสโฟไลเปสเอทูแอลฟานั้นถือเป็นโมเลกุลสื่อสัญญาณที่สำคัญสำหรับการกระตุ้นเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-9 จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการยับยั้ง เอนไซม์ฟอสโฟไลเปสดี และ/หรือ เอนไซม์ไซโตโซลิค ฟอสโฟไลเปสเอทูแอลฟา น่าจะมีประโยชน์ในการบำบัดรักษาโรคในช่องปากที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบซึ่งกระบวนการเกิดโรคเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส-9 เช่น โรคปริทันต์ และ ไลเคนเพลนัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved