การตอบสนองของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของคนต่อการกระตุ้นด้วย โทลล์ไลคีรีเซพเตอร์ไลแกนและนิโคติน

นางสาว มุทิตา เอกสมทราเมษฐ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปริทันตศาสตร์ ภาควิชาปริทันตวิทยา
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE RESPONSE OF HUMAN GINGIVAL EPITHELIAL CELLS TO TOLL-LIKE RECEPTOR LIGANDS AND NICOTINE

Miss Mutita Eksomtramate

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Periodontics
Department of Periodontology
Faculty of Dentistry
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

492112

Thesis Title	The response of human gingival epithelial cells to Toll-like receptor ligands and nicotine
By	Miss Mutita Eksomtramate
Field of study	Periodontics
Thesis Advisor	Assistant Professor Rangsini Mahanonda, Ph.D
Thesis Co-advisor	Sathit Pichyangkul, Ph.D

Accepted by the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Dentistry
(Assistant Professor Thitima Pusiri)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Naulchavee Hongprasong)

.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Rangsini Mahanonda, Ph.D)

.....Thesis Co-advisor
(Sathit Pichyangkul, Ph.D)

.....Member
(Professor Stitaya Sirisinha, Ph.D)

.....Member
(Assistant Professor Kitti Torrungruang, Ph.D)

มุทิตา เอกสมทราเมษฐ์ การตอบสนองของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของคนต่อการกระตุ้นด้วยโทลล์ไลค์รีเซพเตอร์ ไลแกนและนิโคติน (THE RESPONSE OF HUMAN GINGIVAL EPITHELIAL CELLS TO TOLL-LIKE RECEPTOR LIGANDS AND NICOTINE). อ. ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. รังสินี มหานนท์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.สาธิต พิชญางกูร, 83 หน้า.

เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของคนเป็นด่านแรกที่สำคัญของอวัยวะปริทันต์ เนื่องจากตลอดเวลาเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกจะสัมผัสกับเชื้อโรคทั้งชนิดที่มีประโยชน์และชนิดที่ก่อให้เกิดโรค รวมถึงสารพิษต่างๆ ดังนั้นการตอบสนองของเยื่อบุผิวเหงือกจึงมีความสำคัญในการรักษาสมดุลของช่องปาก เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกสามารถผลิตเบต้าดีเฟนซิน 2 (Human β-defensin 2 : HBD-2) ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) ที่สำคัญ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมีการแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอนเอ (mRNA) ของโทลล์ไลคีรีเซพเตอร์ชนิด 1, 2, 3, 5, 9 และ 10 อย่างชัดเจน ส่วนเมสเซนเจอร์อาร์เอนเอ (mRNA) ของโทลล์ไลคีรีเซพเตอร์ ที่ 4 มีการแสดงออกในระดับต่ำ และไม่พบการแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอนเอของโทลล์ไลคีรีเซพเตอร์ที่ 7 และ 8 เมื่อกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกด้วย highly purified TLR2 ligand (*P. gingivalis* LPS), TLR3 ligand (poly I:C) และ TLR5 ligand (*Salmonella thyphimurium* flagellin) วัดด้วยวิธีรีเวอร์สทรานส์คริปเตส-โพลิเมอร์เรสเชนรีแอกชั่น (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) พบว่า สามารถทำให้เกิดการแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอนเอของเบต้าดีเฟนซิน 2 ในขณะที่เมื่อกระตุ้นด้วย TLR9 ligand (CpG ODN 2006)ไม่สามารถทำให้เกิดการแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอนเอของ HBD-2 แม้ว่าเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกจะมีการแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอนเอของโทลล์ไลคีรีเซพเตอร์ ที่ 9 นอกจากนี้การกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวร่วมกันระหว่าง *P. gingivalis* LPS และทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์ อัลฟ่า (TNF-α) พบว่า สามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกผลิตเบต้าดีเฟนซิน 2 มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วย *P. gingivalis* LPS หรือ TNF-α อย่างเดียว ($p<0.05$) การสูบบุหรี่มีความสัมพันธ์กับการก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ โดยนิโคตินเป็นส่วนประกอบหลักของบุหรี่ซึ่งมีผลกดระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่รายงานถึงผลของนิโคตินต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบอินเนทในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกในแง่การผลิตสารต้านจุลชีพ เมื่อเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกได้รับนิโคตินความเข้มข้นต่างๆที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกที่ถูกกระตุ้นด้วย *P. gingivalis* LPS และTNF-α ผลิต HBD-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกที่ได้รับการกระตุ้นแต่ไม่มีนิโคติน ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นความสำคัญถึงบทบาทของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกในแง่ของการมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดของอวัยวะปริทันต์โดยผ่านทาง TLR และแสดงถึงผลของนิโคตินต่อการกดความสามารถในการผลิตสารต้านจุลชีพของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก ซึ่งจะสนับสนุนแนวคิดที่ว่าการสูบบุหรี่เป็นปัจจัยเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ

ภาควิชา .....ปริทันตวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....มุทิตา เอกสมทราเมษฐ์.....

สาขาวิชา.....ปริทันตศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4876119532 : MAJOR PERIODONTICS

KEY WORD: HUMAN GINGIVAL EPITHELIAL CELL / TOLL-LIKE RCEPTORS / HUMAN β-DEFENSIN-2 / PERIODONTITIS / NICOTINE / INNATE IMMUNITY

MUTITA EKSOMTRAMATE: THE RESPONSE OF HUMAN GINGIVAL EPITHELIAL CELLS TO TOLL-LIKE RECEPTER LIGANDS AND NICOTINE. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. RANGSINI MAHANONDA, Ph.D, THESIS CO-ADVISOR : SATHIT PICHYANGKUL, Ph.D, 83 pp.

Human gingival epithelial cells (HGECs) are strategically placed cells of periodontium. They continually expose to oral commensal, pathogenic bacteria as well as harmful agents and their response is important for keeping homeostasis. Human β-defensin 2 (HBD-2) is recognized as an important anti-microbial peptide and the major source is HGECs. In the present study, we demonstrated that HGECs from healthy periodontal tissues clearly expressed mRNA of TLRs 1, 2, 3, 5, 9, 10, and minimally expressed TLR4, but did not express TLRs 7 and 8. Stimulation of HGECs with highly purified TLR2 ligand *(P. gingivalis* LPS), TLR3 ligand (poly I:C), and TLR5 ligand (*Salmonella typhimurium* flagellin) led to expression of HBD-2 as measured by RT-PCR. A potent TLR 9 ligand, CpG ODN 2006 had no effect, although HGECs showed a detectable TLR9 mRNA expression. Combination of key periodontopathic: *P. gingivalis* LPS and pro-inflammatory cytokine: TNF-α significantly enhanced HBD-2 expression in HGECs as compared to a single-stimulation. Cigarette smoking has a strong association with periodontitis. Nicotine, a major component of cigarette smoke, is known to have several biologic effects in suppressing immunological defense mechanism. Our study is the first to report the effect of nicotine on an innate immune response of HGECs. Treatment of nicotine at a non-toxic dose led to significantly down-regulated HBD-2 expression by HGECs in response to *P. gingivalis* LPS and TNF-α as compared to the non-treatment ($p<0.05$). Overall our results suggest a critical role of HGECs in orchestrating the innate immune responses of periodontal tissue via TLR signaling. The response of HGECs specifically, in HBD-2 production could be suppressed by nicotine, therefore well supporting the concept of smoking as an important risk factor in periodontitis.

Department .....Periodontology.....
Field of study.....Periodontics.....
Academic year....2006.....

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor, Assistant Professor Dr. Rangsini Mahanonda, for her guidance, encouragement, supervision, suggestion and kindness throughout the course of my Master degree program. I am extremely indebted to my co-advisor, Dr. Sathit Pichyangkul, Department of Immunology and Medical Component, AFRIMS, for providing the laboratory facilities and his grateful guidance, supervision, valuable technical advice and correction of this thesis. I wish to thank my thesis committee members; Associate Professor Naulchavee Hongprasong, Professor Dr. Stitaya Sirisinha, and Assistant Professor Dr. Kitti Torrungruang for their suggestions and kindness in being committee members.

Sincere appreciation is expressed to Mr. Noppadol Sa-Ard-lam for his assistance in setting the experiments and preparing this manuscript. I also would like to thank Ms. Pimprapa Rerkyen for kind advice and technical assistance.

I would like to acknowledge research grant from the Graduate School, Chulalongkorn University for the partial financial support for this study. My sincere appreciation is also extended to the staff of Periodontology Department, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for providing the gingival biopsy and for their kindness, guidance and encouragement. Finally, I would like sincerely to thank my father, my mother, my brothers, my sisters and my friends for their love, caring, understanding and encouragement.

TABLE OF CONTENTS

Page

Abstract (Thai) iv

Abstract (English) v

Acknowledgements vi

Table of contents vii

List of tables ix

List of figures x

Abbreviations xiii

Chapter

I. Introduction 1

1.1 Background of the present study 1

1.2 Objectives 5

1.3 Hypothesis 5

1.4 Field of research 5

1.5 Criteria inclusions 6

1.6 Limitation of research 6

1.7 Application and expectation of research 6

II. Literature review 8

2.1 Innate immunity 8

2.1.1 Introduction 8

2.1.2 Toll – like receptor 9

2.2 Periodontitis and cigarette smoking 12

2.2.1 Nicotine 14

2.3 Gingival epithelail cell 15

2.3.1 Toll – like receptors on human gingival epithelium 17

2.4 Human β-defensin-2 18

Page

III. Materials and methods 22
3.1 Medium 22
3.2 Reagents 22
3.3 Cell isolation and culture 23
3.3.1 HGEC culture 23
3.3.2 Preparation of PBMC 24
3.4 mRNA expression of TLR in HGECs 25
3.5 HBD-2 expression after stimulation of HGECs by TLR ligands 27
3.6 Nicotine treatment of HGECs 28
3.7 Statistic analysis 28
3.8 Budget 29
IV. Results 30
4.1 mRNA expression of TLR on HGECs 30
4.2 TLR ligands stimulate expression of HBD-2 32
4.3 Combination of *P. gingivalis* LPS and TNF-α stimulates expression of epithelial HBD-2 34
4.4 Non-toxic doses of nicotine 36
4.5 The effect of nicotine on HBD-2 expression in un-stimulated HGECs 38
4.6 The effect of nicotine on HBD-2 expression in stimulated HGECs 40
V. Discussion and conclusion 42
References 47
Appendices 62
Biography 83

LIST OF TABLES

Table Page

1. Human Toll-like receptors and their ligands 11
2. Toll-like receptor-specific ligands used in stimulating HGECs 23
3. Primer sequences of TLR, HBD-2 and GAPDH 26
4. Cell viability of nicotine-treated HGECs by MTT 36

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1A.	TLR mRNA expression (TLRs 1-10) on HGECs	31
1B.	TLR mRNA expression (TLRs 1-10) on PBMC	31
2A.	Expression of HBD-2 in HGECs after stimulation with various TLR ligands	33
2B.	Semiquantitative analysis of HBD-2 expression after stimulation with various TLR ligands (mean ratio of HBD-2:GAPDH± SEM)	33
3A.	Expression of HBD-2 in HGECs with *P. gingivalis* LPS and TNF-α combination	35
3B.	Semiquantitative analysis of HBD-2 expression after stimulation with *P. gingivalis* LPS and TNF-α combination (mean ratio of HBD-2:GAPDH± SEM)	35
4.	Toxicity test of nicotine treatment in HGEC culture	37
5A.	The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression in unstimulated HGECs	39
5B.	Semiquantitative analysis of HBD-2 expression in unstimulated HGECs (mean ratio of HBD-2:GAPDH± SEM)	39
6A.	The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression in stimulated HGECs	41
6B.	Semiquantitative analysis of HBD-2 expression in stimulated HGECs (mean ratio of HBD-2:GAPDH± SEM)	41
7A.	TLR mRNA expression (TLRs 1-10) on HGECs	63
7B.	TLR mRNA expression (TLRs 1-10) on HGECs	63
7C.	TLR mRNA expression (TLRs 1-10) on HGECs	64
7D.	TLR mRNA expression (TLRs 1-10) on PBMC	64
8A.	Expression of HBD-2 in HGECs and semiquantitative analysis after stimulation with various TLR ligands	65
8B.	Expression of HBD-2 in HGECs and semiquantitative analysis after stimulation with various TLR ligands	66
8C.	Expression of HBD-2 in HGECs and semiquantitative analysis after stimulation with various TLR ligands	67

Figure Page

8D. Expression of HBD-2 in HGECs and semiquantitative analysis after stimulation with various TLR ligands 68
9A. Expression of HBD-2 in HGECs and semiquantitative analysis after stimulation with *P. gingivalis* LPS and TNF-α combination 69
9B. Expression of HBD-2 in HGECs and semiquantitative analysis after stimulation with *P. gingivalis* LPS and TNF-α combination 70
9C. Expression of HBD-2 in HGECs and semiquantitative analysis after stimulation with *P. gingivalis* LPS and TNF-α combination 71
9D. Expression of HBD-2 in HGECs and semiquantitative analysis after stimulation with *P. gingivalis* LPS and TNF-α combination 72
10A. The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression and semiquantitative analysis in unstimulated HGECs 73
10B. The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression and semiquantitative analysis in unstimulated HGECs 74
10C. The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression and semiquantitative analysis in unstimulated HGECs 75
10D. The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression and semiquantitative analysis in unstimulated HGECs 76
10E. The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression and semiquantitative analysis in unstimulated HGECs 77
11A. The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression and semiquantitative analysis in stimulated HGECs 78
11B. The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression and semiquantitative analysis in stimulated HGECs 79
11C. The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression and semiquantitative analysis in stimulated HGECs 80
11D. The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression and semiquantitative analysis in stimulated HGECs 81

Figure Page

11E. The effect of nicotine on epithelial HBD-2 expression and semiquantitative analysis in stimulated HGECs 82

LIST OF ABBREVIATIONS

A. actinomycetemcomitans	*Actinobacillus actinomycetemcomitans*
CD	cluster of differentiation
CpG ODN	cytidine-phosphate-guanosine oligonucleotide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
GAPDH	glyceraldehyde-3–phosphate dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HBD-1	human β-defensin-1
HBD-2	human β-defensin-2
HBD-3	human β-defensin-3
HGECs	human gingival epithelial cells
IFN	interferon
IL	interleukin
KGM	keratinocyte growth medium
LL-37	human cathelicidin-derived peptide LL37
LPS	lipopolysaccharide
MICs	minimal inhibitory concentrations
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MyD88	myeloid differentiation primary-response protein 88
NHANES	national health and nutrition examination survey
P. gingivalis	*Porphyromonas gingivalis*
P.g. LPS	*Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide
PAMPs	pathogen–associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
Poly I:C	polyinosine-polycytidylic acid

PRRs	pattern recognition-receptors
RT-PCR	reverse transcriptase–polymerase chain reaction
SEM	standard error of mean
ssPolyU	single strand poly-uridine
TLRs	toll–like receptors
TNF	tumor necrosis factor