

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการแสดงออกของเอนไซม์ เอ็มพี-1 และเอ็มเอ็มพี-9 จากการกระตุ้นด้วยด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส

(Inhibitory effect of *Morus alba* stem extract on *P. gingivalis* LPS- induced MMP- 1 and MMP- 9 expression)

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ทพญ.ดร. อิชยา เยี่ยมวัฒนา คณะทันตแพทยศาสตร์

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน.....

เลขทะเบียน 1041988

เลขเรียกหนังสือ ๘ ๑๙

๒๐1

.P7333
๑ ๖18

๒๕6๒

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2561

แบบสรุปผู้บริหาร

[Executive Summary]

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย / แผนงานวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

(ภาษาไทย) ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการแสดงออกของเอ็มเอ็มพี-1 และเอ็มเอ็มพี-9 จากการกระตุ้นด้วยด้อยไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวาลิส

(ภาษาอังกฤษ) Inhibitory effect of *Morus alba* stem extract on *P. gingivalis* LPS-induced MMP-1 and MMP-9 expression

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย (นาย นาง นางสาว)

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.อิชยา เยี่ยมวัฒนา หัวหน้าโครงการ

ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000 โทรศัพท์ 0-5596-6895 โทรสาร 0-5596-5053

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2561 จำนวนเงิน 272,000.00 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี 6 เดือน เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2560 ถึง มีนาคม 2562

2. สรุปโครงการวิจัย

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

โรคปริทันต์เป็นหนึ่งในโรคในช่องปากที่พบบากที่สุดทั่วโลก โรคปริทันต์ระดับรุนแรงซึ่งอาจทำให้สูญเสียฟันพบประมาณร้อยละ 15-20 ของผู้ใหญ่ในกลุ่มอายุ 35-44 ปี (WHO, 2012) โรคปริทันต์เป็นโรคที่มีการอักเสบของอวัยวะรอบๆ ฟันที่เรียกว่าอวัยวะปริทันต์ได้แก่ เหงือก กระดูกเบ้าฟัน เอ็นยึดปริทันต์ และเคลือบรากฟันเกิดการทำลายอวัยวะเหล่านี้จึงนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด (Feng and Weinberg, 2006) พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างสมบูรณ์ แต่เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าเกิดจากส่วนประกอบของเชื้อแบคทีเรียหรือผลผลิตของเชื้อไปกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้ตอบสนองโดยการหลั่งสารที่มีฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ตัวอย่างเช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides: LPS) จากแบคทีเรีย สามารถกระตุ้นให้เซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อปริทันต์ และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น แมคโครฟาจ (macrophage) ผลิตโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ เช่น สารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) และเอนไซม์ (enzymes) หลายชนิดออกมามีผลเกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ (Kornman, 2008) พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*) ถือว่าเป็น

แบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญของโรคปริทันต์อักเสบ (van Winkelhoff et al., 2002) โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมเนกาทีฟ (Gram-negative) ชนิดไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (anaerobic) ที่ประกอบด้วยปัจจัยความรุนแรงที่สำคัญได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (O'Brien-Simpson et al., 2004) ในระหว่างการดำเนินโรคปริทันต์อักเสบ เชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิสจะปล่อยเยื่อหุ้มชั้นนอกที่มีไลโปโพลีแซคคาไรด์ออกมาแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อปริทันต์และเป็นสื่อกลางในการตอบสนองภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการอักเสบและการทำลายเนื้อเยื่ออวัยวะปริทันต์ (Darveau, 2009)

กระบวนการสลายกระดูกต้องอาศัยไซโทไคน์ เอนไซม์ และปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง (Cochran, 2008; Schwartz et al., 1997) เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (Matrix metalloproteinase; MMP) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม endopeptidase ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนที่เป็นส่วนสำคัญสำหรับเมทริกนอกเซลล์ เอนไซม์ชนิดนี้ส่วนใหญ่สร้างจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue cell) เช่น ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ที่แยกมาจากมนุษย์ (human periodontal ligament fibroblast; hPDL) และเซลล์สลายกระดูก เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอสมีหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มที่ย่อยคอลลาเจนประกอบด้วย MMP-1, MMP-8, MMP-13 กลุ่มที่ย่อยเจลาติน (gelatin) ประกอบด้วย MMP-2, MMP-9 (Verma and Hansch, 2007) การเพิ่มปริมาณเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอสนำไปสู่การกระตุ้นการทำลายส่วนเมทริกของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งสัมพันธ์กับโรคที่แสดงพยาธิสภาพของกระดูก เช่น โรคปริทันต์อักเสบ (Visse and Nagase, 2003; Sorsa et al., 2006) การศึกษาโดยการตรวจหาเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอสในเนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่มผู้ที่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์โดยการย้อมเนื้อเยื่อ (immunohistochemistry) สามารถพบ MMP-1, MMP-2 และ MMP-9 (Ingman et al., 1994; Dong et al., 2009) และจากการตรวจระดับ MMP ในน้ำเหลืองเหงือก และน้ำลายด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนแอสเสย์ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA) พบ MMP ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยปริทันต์อักเสบ (Cao et al., 2010; Ozmeric, 2004) ดังนั้น MMP-1, MMP-2, และ MMP-9 จึงเป็นเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอสชนิดที่สำคัญต่อการย่อยสลายคอลลาเจนในกระดูกเบ้าฟัน

Morus alba Linn. อยู่ในวงศ์ Moraceae หรือหม่อนเป็นพืชสมุนไพรที่ส่วนประกอบต่างๆ ของต้นถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณในทวีปเอเชียมาเป็นระยะเวลายาวนาน โดยชาวจีนใช้เปลือกราก กิ่งอ่อน ใบ ผล เป็นยาบำรุง แก้โรคเกี่ยวกับทรวงอก ขับปัสสาวะแก้ไอ หืด วัณโรคปอด การสะสมน้ำในร่างกาย ผิดปกติ โรคปวดข้อ ส่วนเปลือกต้นใช้เป็นยาถ่าย และยาขับพยาธิ ในยาแผนโบราณของไทยนำกิ่งต้นหม่อนมาใช้ในการรักษาข้ออักเสบ ปวดแขน ขาบวม หรือมือเท้าแข็งเกร็ง เส้นตึง เท้าเป็นตะคริว เป็นเหน็บชา (วิทยา, 2011) สารทุติยภูมิจากการสกัดโคนต้นหม่อนด้วยเอทานอล (ethanol) พบว่า มีองค์ประกอบหลักเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และสารออกซีเรสเวอราทรอล (oxyresveratrol; 2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) (Yhirayha et al., 2014) คุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดโคนต้นหม่อนพบได้หลากหลายตัวอย่าง เช่น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase (Kim et al., 2002; Sritularak et al., 1998) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Lorenz et al., 2003) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Soonthornsit et al., 2013) จนถึงปัจจุบันนี้ ข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อ

การป้องกันการถูกทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์มีอยู่จำกัด ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จะทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดโคนต้นหม่อน นอกจากนี้ จะศึกษาผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อกลไกในระดับโมเลกุลของการส่งสัญญาณในเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 เพื่อสนับสนุนการแพทย์แผนไทยในการใช้สารสกัดโคนต้นหม่อน เพื่อลดการอักเสบและเสริมการรักษา (adjunctive treatment) โรคปริทันต์อักเสบ

วัตถุประสงค์การวิจัย

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการผลิตเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 โดยเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิส และศึกษาการยับยั้งกระบวนการอักเสบของเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิส ผ่านการส่งสัญญาณใน NF- κ B signaling pathways

สมมุติฐานของการวิจัย

โมโนไซต์เป็นเซลล์ชนิดที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ไม่จำเพาะเจาะจง (innate immune system) ของมนุษย์ โดยเซลล์ชนิดนี้สามารถแสดงการตอบสนองต่อแบคทีเรียก่อโรคและผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรีย ปฏิกริยาระหว่างไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์มีบทบาทสำคัญต่อการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ สารสกัดโคนต้นหม่อนมีผลต่อการผลิตเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 ในเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิส เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารสกัดโคนต้นหม่อน และมีผลการส่งสัญญาณใน NF- κ B signaling pathways

ระเบียบวิธีการวิจัย

นำส่วนโคนต้นหม่อนมาสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำมาทำแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้น นำโคนต้นหม่อนแห้งมาสกัดสารออกฤทธิ์โดยผสมกับตัวทำละลายคือเอทานอลร้อยละ 80 ทำการสกัด 2 รอบที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาดรู 45 ไมโครเมตร เพื่อแยกเศษของแข็งออก ของเหลวที่ผ่านกระดาษกรองไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การศึกษานี้เป็นการทดสอบหาความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารสกัดโคนต้นหม่อนที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิส ที่ความเข้มข้น 0 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบกับเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดโคนต้นหม่อนที่เป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีเอส (MTS assay) และการตรวจสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยโพลีแซคคาไรด์ของฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิवालิสโดยการวัดการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 ในห้องปฏิบัติการของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธนบุรี และวัดการแสดงออกด้วยวิธีขยายจำนวนสารพันธุกรรมแบบเวลาจริง และเอนไซม์

ลิ่งคิมมูโนซอบเบนแอสเสย์ รวมทั้งศึกษาผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อกลไกในระดับโมเลกุลของการส่งสัญญาณ NF- κ B signaling pathways โดยการทดลองนำสารสกัดโคนต้นหม่อนมาใช้ในการยับยั้งการสลายโมเลกุล I κ B α (inhibitor of kappa B alpha) ด้วยวิธี Western blot analysis

ผลการวิจัย

ไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสสามารถกระตุ้นการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 ในเซลล์โมโนไซด์ของมนุษย์ชนิด THP-1 อย่างไรก็ตาม การเติมสารสกัดโคนต้นหม่อนที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะยับยั้งการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเก็บรหัสและโปรตีนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ สารสกัดโคนต้นหม่อนที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรยังมีผลยับยั้งการสลายตัวของโปรตีน I κ B α ซึ่งทำให้ NF- κ B ไม่สามารถเคลื่อนตัวจากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียสและเพื่อทำหน้าที่เป็น transcriptional factors ทำให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องได้ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สารสกัดโคนต้นหม่อนอาจจะมีผลต่อการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 ในเซลล์โมโนไซด์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ผลการศึกษานี้จะนำไปสู่วิธีการรักษาโรคปริทันต์แบบใหม่ที่ทำให้ผลการรักษาดีกว่าวิธีเดิม



Title Inhibitory effect of *Morus alba* stem extract on *P. gingivalis* LPS-induced MMP-1 and MMP-9 expression

Author Ichaya Yiemwattana

Keywords *Morus alba* L., matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9, Lipopolysaccharide, THP-1

บทคัดย่อ

ความเป็นมา: โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีการอักเสบเรื้อรังและเป็นสาเหตุสำคัญของการสูญเสียฟันในผู้ใหญ่ สารสกัดโคนต้นหม่อนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ แต่หลักฐานที่แสดงการต้านการอักเสบของสารสกัดโคนต้นหม่อนในโรคปริทันต์ยังมีจำกัด

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลการแสดงออกของสารสื่อการอักเสบชนิดเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 ในเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส

วิธีดำเนินการวิจัย: การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยทำการทดลองศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ของสารสกัดด้วยวิธีเอ็มทีเอส และวัดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอเคีบริหัสและโปรตีนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 จากเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ด้วยวิธีขยายจำนวนสารพันธุกรรมแบบเวลาจริงและวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนแอสเสย์ตามลำดับ รวมทั้ง ศึกษาผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนในการยับยั้งการสลายโมเลกุล I κ B α (inhibitor of kappa B alpha) ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต (Western blot)

ผลการวิจัย: สารไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสสามารถกระตุ้นการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 จากเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 อย่างไรก็ตาม การเติมสารสกัดโคนต้นหม่อนที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรจะยับยั้งการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเคีบริหัสและโปรตีนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) รวมทั้ง ยับยั้งการสลายตัวของโปรตีน I κ B α ในไซโตพลาสซึม

สรุป: การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดโคนต้นหม่อนมีแนวโน้มออกฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้งการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 และเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 จากเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ดังนั้น สารสกัดโคนต้นหม่อนมีศักยภาพที่อาจนำมาใช้เสริมการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ

ABSTRACT

Background: Periodontitis, a chronic inflammatory disease, is the leading cause of tooth loss in adults. Evidence for the anti-inflammatory activity of *M. alba* stem extract (MSE) in periodontal disease is limited.

Objective: To evaluate the inhibitory effects of *M. alba* Stem Extract (MSE) on the expression of matrix metalloproteinases (MMP)-1, MMP-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) activated-THP-1 cells.

Methods: THP-1 cells were treated with non-cytotoxic concentrations of MSE combined with 1 µg/ml of *P. gingivalis* LPS. The mRNA levels of MMP-1, MMP-9, and TIMP-1 were evaluated via quantitative real-time polymerase chain reaction. The secreted proteins in the culture media were detected by ELISA and tracking the degradation of inhibitor of kappa B-alpha (IκBα) protein by Western blotting.

Results: 20 and 40 µg/ml of MSE significantly down-regulated MMP-1 and MMP-9 gene and protein expression but up-regulated the gene expression of TIMP-1 ($P < 0.05$). *P. gingivalis* LPS induced degradation of IκBα, while addition of MSE (20 and 40 µg/ml) increased IκBα cytosolic levels.

Conclusion: MSE was able to suppress the *P. gingivalis* LPS-induced MMPs expression and also increased the gene expression of TIMP-1 via the inhibition of the cytoplasmic IκBα degradation in THP-1 cells. The present observations suggest that MSE exerted a positive effect on the regulatory mechanism between MMPs and TIMP, which is important implications for the therapeutic potential of MSE in periodontitis.

Key words: Matrix metalloproteinases, Lipopolysaccharide, Monocytes, *M. alba* Stem Extract

ABBREVIATIONS

MSE	=	<i>Morus alba</i> stem extract
CAPE	=	caffeic acid phenethyl ester
<i>P. gingivalis</i>	=	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
MMP-1	=	matrix metalloproteinases-1
MMP-9	=	matrix metalloproteinases-9
TIMP-1	=	tissue inhibitors of metalloproteinases-1
NF- κ B	=	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
I κ B α	=	inhibitor of kappa B-alpha
IL-1	=	interleukin-1
TNF- α	=	tumor necrosis factor alpha
LPS	=	lipopolysaccharides
GCF	=	gingival crevicular fluid
iNOS	=	inducible nitrogen oxide synthase
NO	=	nitrogen oxide
TBS	=	tryptic soy broth
BHI	=	brain heart infusion
FBS	=	fetal bovine serum
DMSO	=	dimethylsulfoxide
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
PCR	=	polymerase chain reaction

GAPDH = Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

μg = microgram

ml = milliliter

ANOVA = analysis of variance



LIST OF CONTENTS

	Page
ABBREVIATIONS	1
Chapter	
I INTRODUCTION.....	3
Rationale for the Study	3
Statement of Problem	3
Objectives of the Study	4
Hypothesis of the Study	4
Scopes of the Study	5
Expected Benefit	5
II REVIEW OF RELATED LITERATURE AND RESEARCH.....	6
Periodontal diseases	6
Metalloproteinases: MMPs	7
Tissue inhibitors of metalloproteinases: TIMPs	8
<i>Morus alba</i>	8
III RESEARCH METHODOLOGY.....	10
Materials and Methods	10
Statistic Analysis	12
Project Time line	13
Financial Analysis	13

LIST OF CONTENTS (CONT.)

Chapter	Page
IV RESULTS	15
Cytotoxic effect of MSE on THP-1 cells	15
MSE inhibits <i>P. gingivalis</i> LPS- induced MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 mRNA expression	16
MSE inhibits <i>P. gingivalis</i> LPS- induced MMP-1 and MMP-9 production	17
MSE inhibits <i>P. gingivalis</i> LPS-induced κ B α degradation	18
V DISCUSSION AND CONCLUSION	20
Discussion	20
Conclusion	21
REFERENCES.....	22
APPENDIX	28
BIOGRAPHY.....	41

LIST OF TABLES

Table	Page
1 Project Time line	13
2 Financial Analysis	13
3 Inhibition zone of MSE against periodontal pathogens	19
4 MICs and MBCs of Mulberry stem extract against the periodontal pathogens	19



LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Effect of <i>P. gingivalis</i> LPS (a) and MSE (b) on cell viability in hPDL fibroblasts	15
2 MSE suppressed IL-6 (a) and IL-8 (b) mRNA expression in hPDL fibroblasts <i>P.gingivalis</i> LPS stimulated HGFs	16
3 MSE suppressed IL-6 (a) and IL-8 (b) secretion in hPDL fibroblasts.....	17



CHAPTER I

INTRODUCTION

Rationale for the Study and Statement of Problem

โรคปริทันต์เป็นหนึ่งในโรคในช่องปากที่พบมากที่สุดทั่วโลก โรคปริทันต์ระดับรุนแรงซึ่งอาจทำให้สูญเสียฟันพบประมาณร้อยละ 15-20 ของผู้ใหญ่ในกลุ่มอายุ 35-44 ปี (WHO, 2012) โรคปริทันต์เป็นโรคที่มีการอักเสบของอวัยวะรอบๆ ฟันที่เรียกว่าอวัยวะปริทันต์ได้แก่ เหงือก กระดูกขาฟัน เอ็นยึดปริทันต์ และเคลือบรากฟันเกิดการทำลายอวัยวะเหล่านี้จนนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด (Feng and Weinberg, 2006) พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างสมบูรณ์ แต่เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าเกิดจากส่วนประกอบของเชื้อแบคทีเรียหรือผลผลิตของเชื้อไปกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้ตอบสนองโดยการหลั่งสารที่มีฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ตัวอย่างเช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides: LPS) จากแบคทีเรีย สามารถกระตุ้นให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น แมคโครฟาจ (macrophage) และโมโนไซด์ (monocyte) ผลิตโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ เช่น ไซโตไคน์ (cytokines) และสารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) หลายชนิดออกมาซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ (Kornman, 2008) พอร์ไฟโรโมนัส จิงจีวาลิส (*Porphyromonas gingivalis*) ถือว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญของโรคปริทันต์อักเสบ (van Winkelhoff et al., 2002) โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมเนกาทีฟ (Gram-negative) ชนิดไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (anaerobic) ที่ประกอบด้วยปัจจัยความรุนแรงที่สำคัญได้แก่ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (O'Brien-Simpson et al., 2004) ในระหว่างการดำเนินโรคพอร์ไฟโรโมนัส จิงจีวาลิสจะปล่อยเยื่อหุ้มชั้นนอกที่มีไลโปโพลีแซคคาไรด์ออกมาแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อปริทันต์และเป็นสื่อกลางในการตอบสนองภูมิคุ้มกันและเกิดการอักเสบในเนื้อเยื่อ (Darveau, 2009) ในระยะแรกของการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ เซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อปริทันต์ถูกกระตุ้นและเหนี่ยวนำจากแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ให้มีการสังเคราะห์และหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบ รวมทั้ง เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (matrix metalloproteinases) ชนิดต่าง ๆ ขึ้น เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสเป็นกลุ่มเอนไซม์ในร่างกาย ซึ่งค้นพบแล้วอย่างน้อย 21 ชนิดในปัจจุบัน กลุ่มเอนไซม์นี้อาศัยอะตอมสังกะสีเป็นตัวร่วมในการทำงาน มีโครงสร้างสับสเตรทแตกต่างกันจึงออกฤทธิ์ทั้งเสริมหรือลดขบวนการต่าง ๆ หลายชนิดในร่างกาย โดยมีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย pro-domain ทำหน้าที่ควบคุมการทำงาน และ catalytic domain ทำงานเกี่ยวข้องกับไซโตไคน์โดยนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบมีผลต่อการกระตุ้น proMMP ขณะเดียวกันเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสก็สามารถกระตุ้นไซโตไคน์ และไซโตไคน์รีเซพเตอร์ (cytokine receptors) การทำงานของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสถูกควบคุมให้มีความสมดุลด้วยระบบการสังเคราะห์และการยับยั้งการทำงาน โดยตัวยับยั้งฤทธิ์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (tissue inhibitors of

metalloproteinases: TIMPs) สร้างขึ้นทั้งใน สภาวะปกติและสภาวะพยาธิสภาพ มีบทบาทเป็นตัวควบคุม (regulatory molecule) ที่สำคัญในขบวนการขบวนการจัดโครงสร้างเนื้อเยื่อในภาวะต่าง ๆ โดยเปลี่ยนแปลงสภาวะรอบนอกเซลล์ด้วยการย่อยโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสพบมีการสร้างและหลั่งออกจากเซลล์บ้างอยู่แล้วในสภาวะปกติและถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นโดยซัยโตไคน์ โกรทแฟคเตอร์และการติดเชื้อแบคทีเรีย

Morus alba Linn. อยู่ในวงศ์ Moraceae หรือหม่อนเป็นพืชสมุนไพรที่ส่วนประกอบต่างๆ ของต้นถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณในทวีปเอเชียมาเป็นระยะเวลายาวนาน โดยชาวจีนใช้เปลือกกราก กิ่งอ่อน ใบ ผล เป็นยาบำรุง แก้โรคเกี่ยวกับทรวงอก ขับปัสสาวะแก้ไอ ทืด วัณโรคปอด การสะสมน้ำในร่างกายผิดปกติ โรคปวดข้อ ส่วนเปลือกต้นใช้เป็นยาถ่าย และยาขับพยาธิ ในยาแผนโบราณของไทยนำกิ่งต้นหม่อนมาใช้ในการรักษาข้ออักเสบ ปวดแขน ขาบวม หรือมือเท้าแข็งเกร็ง เส้นตึง เท้าเป็นตะคริว เป็นเห็บขา (วิทยา, 2011) สารทุติยภูมิจากการสกัดโคณฑันหม่อนด้วยเอทานอล (ethanol) พบว่า มีองค์ประกอบหลักเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และสารออกซีเรสเวอรอล (oxyresveratol; 2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) (Yhirayha et al., 2014) คุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดโคณฑันหม่อนพบได้หลากหลายตัวอย่าง เช่น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase (Kim et al., 2002; Sritularak et al., 1998) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Lorenz et al., 2003) และฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Soonthornsit et al., 2013) จนถึงปัจจุบันนี้ ข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาผลของสารสกัดโคณฑันหม่อนต่อการป้องกันการถูกทำลายของเนื้อเยื่อปริทันต์มีอยู่จำกัด ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จะทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ และผลของสารสกัดโคณฑันหม่อนต่อกลไกในระดับโมเลกุลของการส่งสัญญาณในเซลล์โมโนไซต์ที่เอชพี-1 (THP-1) เพื่อสนับสนุนการแพทย์แผนไทยในการใช้สารสกัดโคณฑันหม่อน เพื่อลดการอักเสบและเสริมการรักษา (adjunctive treatment) โรคปริทันต์อักเสบ

Objectives of the Study

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโคณฑันหม่อนต่อไฟโบรบลาสต์ของเอ็นดีปรีทันต์ ที่แยกจากมนุษย์ และประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดโคณฑันหม่อนต่อเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส โดยการศึกษารายการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส -9 และตัวยับยั้งฤทธิ์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 ด้วยวิธีขยายจำนวนสารพันธุกรรมแบบเวลาจริง (real-time PCR) และวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนแอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) รวมทั้ง ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการส่งสัญญาณผ่าน NF-κB signaling pathways

Hypothesis of the Study

โมโนไซต์เป็นเซลล์ชนิดที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่ไม่จำเพาะเจาะจง (innate immune system) ของมนุษย์ โดยเซลล์ชนิดนี้สามารถแสดงการตอบสนองต่อแบคทีเรียก่อโรคและผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรีย ปฏิกริยาระหว่างไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสกับเซลล์โมโนไซต์ของ

มนุษย์มีบทบาทสำคัญต่อการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ สารสกัดโคนตันหมอนมีผลต่อการผลิตเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-9 และตัวยับยั้งฤทธิ์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 ในเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อฟอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิส เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่มีสารสกัดโคนตันหมอน และมีผลการส่งสัญญาณใน NF- κ B signaling pathways

Scopes of the Study

การศึกษานี้เป็นการทดสอบหาความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารสกัดโคนตันหมอนที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไลโปโพลีแซคคาไรด์ของฟอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิสที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบกับเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และการตรวจสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดโคนตันหมอนต่อเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยโพลีแซคคาไรด์ของฟอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิสโดยการวัดการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-9 และตัวยับยั้งฤทธิ์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 ในห้องปฏิบัติการของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดโคนตันหมอนที่เป็นพิษต่อเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ด้วยวิธีเอ็มทีเอส (MTS assay) และวัดการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสและตัวยับยั้งฤทธิ์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส ด้วยวิธีวัดขยายจำนวนสารพันธุกรรมแบบเวลาจริง และเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนแอสเสย์ และฤทธิ์ยับยั้งการสลายโมเลกุล IKBA (inhibitor of kappa B alpha) ด้วยวิธี Western blot analysis

Expected Benefit

โมโนไซต์เป็นเซลล์ชนิดที่สำคัญในเนื้อเยื่อปริทันต์ของมนุษย์ ปฏิกริยาระหว่างส่วนประกอบของเยื่อหุ้มชั้นนอกชนิดไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อฟอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิสกับเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์มีบทบาทสำคัญต่อการอักเสบของอวัยวะรอบๆ ฟัน เมื่อโมโนไซต์ถูกกระตุ้นจะหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด เช่น เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสและตัวยับยั้งฤทธิ์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส สารสกัดโคนตันหมอนได้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติทางชีวภาพหลายแบบรวมถึงคุณสมบัติการต้านการอักเสบและการต้านเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้น สารสกัดโคนตันหมอนอาจมีผลต่อการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-9 และตัวยับยั้งฤทธิ์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 ในเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อฟอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิส และ ผลการส่งสัญญาณใน NF- κ B signaling pathways ผลการศึกษานี้อาจจะนำไปสู่วิธีการรักษาโรคปริทันต์แบบใหม่ที่ทำให้ผลการรักษาดีกว่าวิธีเดิม

CHAPTER II

REVIEW OF RELATED LITERATURE AND RESEARCH

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

โรคปริทันต์เป็นโรคที่เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อฟันที่อยู่รอบฟันได้แก่ การทำลายกระดูกเข้าฟัน และนำไปสู่การสูญเสียฟัน (Feng and Weinberg, 2006) การเกิดพยาธิสภาพของโรคเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง ปัจจัยสำคัญได้แก่ เชื้อก่อโรคปริทันต์ (periodontal pathogens) ที่อยู่ในร่องลึกปริทันต์ และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกาย (host-mediated immune response) แบบที่เรียกว่าสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบมีหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบบที่เรียแกรมลบที่ไม่ใช้ออกซิเจน เช่น พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส (*Porphyromonas gingivalis*) แอคริเกรติแบคเตอร์แอคทีโนมัยซิเทมโคมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) แทนเนอเรลลา ฟอร์ไซเทีย (*Tannerella forsythia*) และพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (*Prevotella intermedia*) เป็นต้น (Socransky and Haffajee, 2005) พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสเป็นแบคทีเรียที่สำคัญในการเริ่มต้นและการดำเนินโรคที่รุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง (chronic periodontitis) และโรคปริทันต์รุกราน (aggressive periodontitis) (Holt and Bramanti, 1991) ส่วนประกอบหลายชนิดของเซลล์พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสเป็นปัจจัยก่อโรค (virulence factor) หลายชนิด เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) (O'Brien-Simpson et al., 2004) ฟิมเบรีย (fimbriae) แคปซูล (capsule) ซีสทีนโปรติเอส (cysteine proteases) และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนหลายชนิด ซึ่งปัจจัยก่อโรคเหล่านี้เป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคปริทันต์ มีรายงานว่า ไลโปโพลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โมโนไซต์ (monocyte) มาโครฟาจ (macrophage) เพิ่มการผลิตและหลั่งสารอักเสบ (inflammatory mediators) รวมทั้งเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนต่างๆ เช่น อินเตอร์ลิวคิน (interleukin; IL) ทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์ (Tumor necrosis factor; TNF) และ เมทริกเมทัลโลโปรติเอส สารเหล่านี้จะไปกระตุ้นปฏิกิริยาการอักเสบและก่อให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ตามมา พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสจึงเป็นแบคทีเรียที่สำคัญในการเริ่มต้นและการดำเนินโรคที่รุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังและโรคปริทันต์รุนแรง (Holt and Bramanti, 1991) ส่วนประกอบของเชื้อชนิดไลโปโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ (Tobias et al., 1997) ไลโปโพลีแซคคาไรด์จากพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสแตกต่างจากไลโปโพลีแซคคาไรด์ของสายพันธุ์ enterobacterial ในคุณสมบัติทางโครงสร้างและการทำงาน (Kumada et al., 1995; Nair et al., 1983) ไลโปโพลีแซคคาไรด์ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นที่มีศักยภาพต่อเซลล์โฮสต์ชนิดต่างๆ ซึ่งต่อมามีผลในการแสดงออกของซัยโตไคน์และสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด และนำไปสู่การตอบสนองที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันในโรคปริทันต์ (Ren et al., 2005) มีรายงานว่า ไลโป

โพลีแซคคาไรด์จากพอร์ไฟโรไมเนส จึงจิวาลิสกระตุ้นการผลิตอินเตอร์ลิวคิน-1 และ อินเตอร์ลิวคิน-8 จากเซลล์จากโมโนไซด์ของมนุษย์ (Yiemwattana and Kaomongkolgit, 2016) และ กระตุ้นการสร้าง *ไนตริกออกไซด์* จากเซลล์แมคโครฟาจของหนู (Shapira et al., 2000) และจากเซลล์แมคโครฟาจของมนุษย์ (Chen et al., 2008) โลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อพอร์ไฟโรไมเนส จึงจิวาลิสก่อให้เกิดกิจกรรมทางชีวภาพและทางระบบภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ ผ่าน Toll-like receptors (TLRs) (Bainbridge and Darveau, 2001)

กระบวนการสลายกระดูกต้องอาศัยไซโตไคน์ เอนไซม์ และปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง (Cochran, 2008; Schwartz et al., 1997) เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสเป็นกลุ่มเอนไซม์ในร่างกาย ปัจจุบันค้นพบแล้วอย่างน้อย 21 ชนิด กลุ่มเอนไซม์นี้ต้องอาศัยอะตอมสังกะสีเป็นตัวร่วมในการทำงาน โดยมีสับสเตรทแตกต่างกันที่มีฤทธิ์เสริมหรือลดขบวนการต่างในร่างกาย มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย pro-domain ทำหน้าที่ควบคุมการทำงาน และ catalytic domain ทำงานเกี่ยวข้องกับไซโตไคน์ โดยเฉพาะไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cytokine) จะมีผลต่อการกระตุ้น proMMP ขณะเดียวกันเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสก็สามารถกระตุ้นไซโตไคน์ และไซโตไคน์รีเซพเตอร์ (cytokine receptors) การทำงานของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสถูกควบคุมให้มีความสมดุลด้วยระบบการสังเคราะห์และการยับยั้ง โดยตัวยับยั้งฤทธิ์ (tissue inhibitors of metalloproteinases: TIMPs) เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส สร้างขึ้นทั้งใน สภาวะปกติและสภาวะพยาธิสภาพ มีบทบาทเป็นตัวควบคุม (regulatory molecule) ที่สำคัญในขบวนการขบวนการจัดโครงสร้างเนื้อเยื่อในภาวะต่างๆ โดยเปลี่ยนแปลงสภาวะรอบนอกเซลล์ด้วยการย่อยโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ ด้วยการออกฤทธิ์ต่อกันตามลำดับขั้น (cascade) นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับขบวนการจัดการ (processing) สารต่างๆ เช่น ไซโตไคน์ โกรทแฟคเตอร์ (growth factors) และ adhesion molecules ให้ได้ชิ้นส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive fragments) ที่มีคุณสมบัติต่อการเสริมหรือยับยั้งในขบวนการอักเสบ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสสามารถจัดแบ่ง 2 เป็นกลุ่มใหญ่ตามตำแหน่งที่พบคือ กลุ่มที่ถูกหลั่งจากเซลล์ (secreted MMPs) และ กลุ่มที่ติดบนผิวเซลล์ (membrane type MMPs) กลุ่มที่ถูกหลั่งจากเซลล์แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มย่อยตามคุณสมบัติที่คล้ายกันบางประการ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ collagenases: เป็นกลุ่มที่มีคุณสมบัติหลักสามารถตัดย่อย collagen I, II, III, V ประกอบด้วย MMP-1 (Collagenase-1), MMP-8 (Collagenase-2) และ MMP-13 (Collagenase-3) กลุ่มที่ 2 คือ stromelysin/ stromelysin-like: เป็นกลุ่ม MMPs ที่มีโครงสร้างและสับสเตรทคล้ายกันประกอบด้วย MMP-3 (stromelysin-1), MMP-10 (stromelysin-2), MMP-11 (stromelysin-3) และ MMP-12 (Macrophage metallo- elastase) กลุ่มที่ 3 คือ matrilysin: เป็น MMPs กลุ่มที่มีขนาดเล็กที่สุด เนื่องจากไม่มีส่วน hinge region และ hemopexin ประกอบด้วย MMP-7 (matrilysin) และ MMP-26 (matrilysin-2) กลุ่มที่ 4 คือ gelatinases: เป็น MMPs ที่สามารถย่อย gelatin และ collagen ซึ่งเป็นโปรตีนเมทริกที่เป็นส่วนประกอบใน basement membrane ทำให้เซลล์ชนิดต่างๆ เช่น T lymphocyte เคลื่อนตัวเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ง่ายขึ้น ประกอบด้วย MMP-2 (gelatinase-A), MMP-9 (gelatinase-B) กลุ่มที่ 5 คือ matrix metalloproteinase 19-like

MMP: ประกอบด้วย MMP-19 และ MMP-28 (epilysin) และกลุ่มอื่นๆ ประกอบด้วย MMP-20 (Enamellysin) และ MMP-23 ส่วนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสกลุ่มที่ติดบนผิวเซลล์ เนื่องจากมีส่วน transmembrane domain และ intracytoplasmic domain เชื่อว่ามีบทบาทหลักในการจับกันระหว่างเซลล์กับเมทริกซ์ ประกอบด้วย MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-27 และ MMP-25

เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสพบมีการสร้างและหลั่งออกจากเซลล์บ้างอยู่แล้วในสภาวะปกติและถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นโดยซัยโตไคน์, โกรทแฟคเตอร์และการติดเชื้อแบคทีเรีย การศึกษาโดยการตรวจหาในเนื้อเยื่อเหลืองในกลุ่มผู้ที่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์โดยการย้อมเนื้อเยื่อสามารถพบ MMP-1, MMP-2 และ MMP-9 ในปริมาณมาก (Ingman et al., 1994; Dong et al., 2009) และจากการตรวจระดับเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนสในน้ำเหลืองเหลือง และน้ำลาย พบ MMP ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวในรอยโรคปริทันต์อักเสบในปริมาณที่สูงกว่าที่พบในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่ปกติ (Cao et al., 2010; Ingman et al., 1996; Ozmeric, 2004) ดังนั้น MMP-1, MMP-2, และ MMP-9 จึง เป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพสูงในการ ทำลายเนื้อเยื่อและเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบ MMP-1, MMP-2 และ MMP-9 มีการสร้างจากเซลล์หลายชนิดในเนื้อเยื่อปริทันต์ โดยไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยัดปริทันต์ที่แยกจากมนุษย์ผลิตและหลั่ง MMP-1 (Cao et al., 2010; Götz et al., 2015) และ MMP-2 (Jang et al., 2011) แมคโครฟาจอาร์เอดับเบิลยู 264.7 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลี แซคคาไรด์พบการสร้าง MMP-9 มากขึ้น (Jang et al., 2011; Lone, 2014)

พืชสมุนไพรบางชนิดได้รับการประเมินว่า สามารถทดแทนสารต้านการอักเสบในการรักษาโรคปริทันต์ร่วมกับการซูดหินน้ำลายและเกลารากฟันที่มีศักยภาพ (Kumar et al., 2009) ต้นหม่อนถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรของชาวเอเชียตะวันออกเฉียงมาเป็นระยะเวลาช้านาน โดยการแพทย์แผนไทยได้ใช้ส่วนต่างๆ ของหม่อนเป็นยา อาหารสุขภาพ และเครื่องสำอาง เช่น ผลหม่อนมีรสเปรี้ยวหวานเย็น มีสรรพคุณช่วยดับร้อน คายความร้อนรุ่ม ขับลมร้อน ทำให้ชุ่มคอ บรรเทาอาการกระหายน้ำทำให้ร่างกายชุ่มชื้น และแก้อาการท้องผูก ใบมีสรรพคุณช่วยขับเหงื่อ แก้ไข้ ไข้หวัด ตัวร้อน ปวดศีรษะ และแก้ร้อนในกระหายน้ำ เมล็ดมีสรรพคุณเป็นยาขับเสมหะ กิ่งหม่อนมีสรรพคุณช่วยทำให้เลือดลมไหลเวียนได้สะดวกมากขึ้น ช่วยขจัดเสลดในปอด ช่วยทำให้ลำไส้ทำงานได้ดี และช่วยขจัดการหมักหมมในกระเพาะอาหาร (วิทยา, 2011; นิจศิริ และธวัชชัย, 2004) โดยสารทุติยภูมิในการสกัดโคนต้นหม่อนด้วยเอทานอล (ethanol) พบว่า มีองค์ประกอบหลักเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารออกซีเรสเวอราทรอล (Yhirayha et al., 2014) สารสกัดจากโคนต้นหม่อนมีคุณสมบัติทางชีวภาพหลายแบบ เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase (Kim et al., 2002; Sritularak et al., 1998) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Lorenz et al., 2003) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Soonthornsit et al., 2013) จากรายงานการศึกษา พบว่า สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติต้านการอักเสบโดยลดการแสดงออกของซัยโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์ แอลฟา อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า อินเตอร์ลิวคิน-6 และอินเตอร์ลิวคิน-8 ในเซลล์หลายชนิด เช่น RAW macrophages, Jurkat T-cells and peripheral blood mononuclear cells (Geng et al., 1993; Santangelo et al., 2007) ส่วนสารออกซีเรสเวอ

ราทอรอล พบว่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีคปริทันต์ที่แยกจากมนุษย์ โดยสามารถยับยั้งการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-6 อินเตอร์ลิวคิน-8 และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสำคัญที่ก่อให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อปริทันต์ ได้แก่ เชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส และแอกกรีเกติแบคเตอร์ แอคติโนไมซีเตมโคมิแทนส์ (Phoolcharoen et al. 2003) ในปัจจุบันยังมีข้อมูลเกี่ยวกับตรวจสอบผลของสารสกัดโคนตันหม่อนต่อการแสดงออกของสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของอวัยวะปริทันต์และการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์อยู่จำกัด ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จะศึกษาการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-9 และตัวยับยั้งฤทธิ์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 ในเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ชนิด THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส รวมทั้ง ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการส่งสัญญาณของสารสกัดโคนตันหม่อนต่อการทำงานของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งสัญญาณผ่าน NF- κ B signaling pathways ในเซลล์ THP-1



CHAPTER III

METHODOLOGY

Materials and Methods

Plant materials and preparation of plant extract

M. alba stems were obtained from the Queen Sirikit Sericulture Center, Tak Province, Thailand. The fresh stems were chopped and dried. Then, the dried plant was extracted by maceration technique using 80% ethanol for 2 cycles at room temperature. The crude extract was filtered through 0.45 μm pore size nylon membrane (VertiClean™, Vertical Chromatography Co., Ltd., Bangkok, Thailand). After filtration, the filtrate was evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator (BUCHI Rotavapor R – 114, Switzerland) and continued drying using a water bath (M25 LAUDA, Germany). Then, the dried powder was stored in tight, light-protected container. The dried crude extract was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to give a concentration of 100 mg/ml as a stock solution for determination of antibacterial activity and *anti-inflammatory* activity of MSE.

Bacteria and culture conditions

Cell culture

This study was approved by the Naresuan University Institutional Review Board (COE No.339/2016). THP-1 cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK). The cells were cultured in RPMI-1640 medium (Hyclone, Cramlington, UK) containing 10% heat-inactivate fetal bovine serum (Hyclone), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 5% CO_2 at 37 °C.

Cell viability assays

THP-1 cells were seeded into 24-well culture plates at 5×10^4 cells per well in DMEM supplemented with 10% FBS for 24h. Then, the medium was replaced with serum free medium and cells were treated with 0, 10, 20, 40, 80 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of MSE or 0, 0.25, 0.5, and 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *P. gingivalis* LPS (InvivoGen, San Diego, CA, USA) in serum free medium for 24 h. The viability of THP-1 cells towards extracts from *M. alba* stem was then measured using the CellTiter 96 aqueous one solution cell proliferation kit following the manufacturer's instructions (MTS assay; Promega, Madison, WI, USA). MTS

working solution was added to each well and incubated for 5 min at 37°C. After transferring 200 µl of supernatant to a 96-well plate, soluble formazan absorbance was recorded using a plate reader at 490 nm. All measurements were performed in triplicate and were repeated on three different occasions ($n = 3$). Cytotoxicity was calculated by expressing absorbance values as a percentage of control values (100% represented zero cytotoxicity).

Quantification of cytokines mRNA by reverse transcription real-time PCR

THP-1 cells (5×10^5 cells per well) were transferred to 6-well plates in serum free medium. The cells were treated with 0, 10, 20 and 40 µg/ml of MSE for 1 h, followed by 1 µg/mL of *P. gingivalis* LPS (InvivoGen, CA, USA). The plates were maintained in an incubator at 37 °C with 5% CO₂ for 24 h. After incubation, the cell culture was collected and centrifuged. The cell supernatant was collected for ELISA. Total RNA was then isolated by Nucleospin RNAII (Macherey-Nagel GmbH&Co. KG) according to the manufacturer's instruction. Concentration and purity of RNA was determined using a Nano Drop ND-2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA). cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA and mixed with LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master (Roche). Two step quantitative–reverse transcription PCR was performed in duplicate using the LightCycler 480 II Real-Time PCR System (Roche). The hot start enzyme was activated (95 °C for 5 min), and cDNA was then amplified for 40 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 20 s and annealing/extension at 60 °C for 20 s. A melt curve assay was then performed (65 °C for 1 min and then the temperature was increased by 1.1°C every 10 s) to detect the formation of primer-derived trimers and dimers. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a control. The sequences of the PCR primers were used as follows: MMP-1, forward, TGGACCTGGAGGAAATCTTGC, and reverse, AGAGTCCAAGAGAAT GGCCGA; MMP-9, forward, GAGGTGGACCGGA TGTTC, and reverse, AAC TCACGCGCCAGTAGAAG; TIMP-1, forward, ACTGCAGGA TGGACTCTTGCA, and reverse, TTTCAGAGCCTTGAGGAGCT. Data were analyzed with the LightCycler® 480 software version 1.5. The average starting quantity of fluorescence units was used for analysis. Quantification was calculated by using GAPDH for internal control.

Measurement of MMP-1, and MMP-9 concentrations by ELISA

After THP-1 cells were stimulated with 1 µg/ml *P. gingivalis* LPS and treated with 20 and 40 µg/ml MSE or 0.05% DMSO for 24 h, the supernatants were collected and the

levels of MMP-1 and MMP-9 protein were measured using the human MMP-1, and MMP-9 ELISA kits (Abcam, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. The optical density of each well at 450 nm was determined using a microplate reader (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA). All measurements were performed in duplicate and repeated at three different occasions. Mean values of the two measurements were used for statistical analysis.

Western blot analysis.

THP-1 cells (5×10^6 cells/well) were preincubated in the absence or presence of 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ of MSE prior to the addition of 1 $\mu\text{g/ml}$ of *P. gingivalis* LPS. After incubation for 30 min, the cells were collected on ice, washed twice with ice-cold PBS, and suspended in 40 μl of the lysis buffer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). The cytoplasmic extracts were prepared as previously described (Weiss et al., 2004). The expressions of I κ B α was assayed in line with Western blotting protocol. Briefly, the volume of extracted protein was determined to 80 μg in each well of 10% SDS polyacrylamide gel and transferred to PVDF membranes. A rabbit anti-I κ B α (44D4) polyclonal antibody (Cell Signalling Technology, MA, USA) was used as the primary antibody for the I κ B α degradation analysis. Immunoreactive bands were detected and analyzed with ChemiDoc MP Imaging System and Image Lab Software (Bio-Rad, California, USA). β -actin was used as the loading control.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software version 19.0. All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Differences between experimental groups were analyzed with analysis of variance (ANOVA) follow by a post-hoc Tukey test in all experiments. The differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

Table 1: ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (Project Time line)

กิจกรรม	เดือนที่												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1. การเตรียมสารสกัดโคณฑันหม่อน	←	→											
2. การแยก และการเพาะเลี้ยงเซลล์ THP-1 monocytes ของมนุษย์		←	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	
3. การศึกษาการทำลายเซลล์ THP-1 หลังจากเติมสารสกัดโคณฑันหม่อนหรือไลโปลิแซคคาไรด์จากเชื้อฟอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิวาลิสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน			←	→									
4. การวัดการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเก็บรหัสของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 และตัวยับยั้งฤทธิ์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 ในเซลล์ THP-1 ด้วยเครื่องขยายจำนวนสารพันธุกรรมแบบเวลาจริง					←	→							
5. การวัดการแสดงออกของโปรตีนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-1 เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-9 จากเซลล์ THP-1 ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงคิอิมมูโนซอบเบนแอสเสย์								←	→				
6. ผลของสารสกัดโคณฑันหม่อนต่อส่งสัญญาณในเซลล์ THP-1										←	→		
7. รวบรวม สรุปผลการทดลอง และเตรียมการนำเสนอ บทความวิจัย												←	→

Table 2: งบประมาณของโครงการวิจัย (Financial Analysis)

รายการ	จำนวนเงิน
1. งบบุคลากร	-
2. งบดำเนินการ	272,000
ก. ค่าตอบแทน	10,000
ค่าตอบแทนการปฏิบัติงานนอกเวลาราชการ	10,000
ข. ค่าใช้สอย	10,000
ค่าเบี้ยเลี้ยง ค่าเช่าที่พัก ค่าพาหนะ สำหรับเดินทางภายในประเทศ	-
ค่าใช้บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์	-
ค่าใช้สอยในการรายงาน ตีพิมพ์ และการนำเสนอผลการวิจัย	10,000
ค. ค่าวัสดุและสารเคมี	252,000

<p>ค่าสารและอุปกรณ์เคมี: DMEM, FBS, penicillin-streptomycin, PBS, CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Kit, <i>P.gingivalis</i> LPS, TRAP staining kit ,TRI Reagent, LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master, PCR primers, ELISA kits, specific antibodies, Griess reagent etc.</p>	202,000
<p>ค่าเครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์: 75 cm³ culture flasks, 4 cm culture plate, 96 well plates, 12-well plates (flat-bottom), serological pipette, pipette tips, 1.5, 5, 15, 50 ml sterilized centrifuge tubes, etc.</p>	40,000
<p>ค่าวัสดุสำนักงาน, วัสดุคอมพิวเตอร์</p>	10,000
<p>3. งบลงทุน</p>	-
<p>รวมงบประมาณที่ใช้ในการวิจัย</p>	<u>272,000</u>

หมายเหตุ ถัดเฉลี่ยจ่ายทุกรายการ

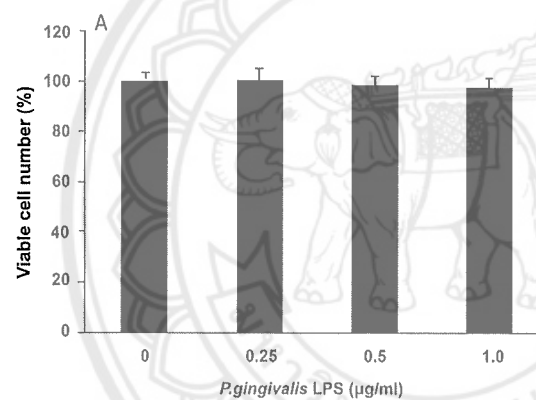


CHAPTER IV

RESULTS

Cytotoxic effect of MSE on THP-1 cells

The cytotoxic activity of *P. gingivalis* LPS for the concentration range of 0-1 $\mu\text{g/ml}$ and MSE for the concentration range of 0-100 $\mu\text{g/ml}$ was evaluated on THP-1 cells. The results showed decreased cell viability in a dose dependent manner. *P. gingivalis* LPS (Figure 1A) showed no cytotoxic effect at the concentrations up to 1 $\mu\text{g/ml}$. MSE at concentrations between 10 and 40 $\mu\text{g/ml}$ were not toxic to THP-1 cells as the cell viability was not significantly altered compared to the non-treated control ($P < 0.05$). However, significant loss of cell viability was observed at the concentrations of 80 and 100 $\mu\text{g/ml}$, indicating cell death [Figure 1B].



B

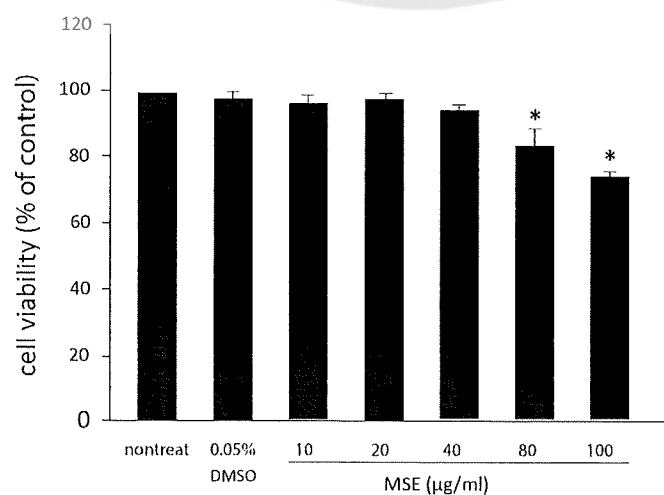


Figure 1: Effect of *P. gingivalis* LPS (A) and MSE (B) on cell viability in THP-1 cells. Cells were treated with various concentrations of *P. gingivalis* LPS or MSE and cell viability was measured by MTS assay at 24 h after exposure. The data are expressed as the percentage of viable cells compared with the non-treated cells (control). The values (mean \pm SD) are the average of three independent experiments performed in triplicate; * indicates significant difference from the control ($P < 0.05$).

MSE inhibits *P. gingivalis* LPS- induced MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 mRNA expression

Expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 mRNA was assessed after treatment of *P. gingivalis* LPS-stimulated THP-1 cells with nontoxic concentrations of MSE. MMP-1 and MMP-9 mRNA expression increased significantly when stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ *P. gingivalis* compared to control, untreated cells ($P < 0.05$). The exposure to 10 $\mu\text{g/ml}$ MSE extract showed no significant difference of both MMP and TIMP-1 mRNA expression compared to *P. gingivalis* LPS-treated cells. MSE extract 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ were able to significantly inhibit mRNA expression of MMP-1 and MMP-9 induced by *P. gingivalis* LPS ($P < 0.05$). However, 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ MSE significantly stimulated mRNA expression of TIMP-1 compared to *P. gingivalis* LPS-treated cells ($P < 0.05$) as shown in Figure 2.

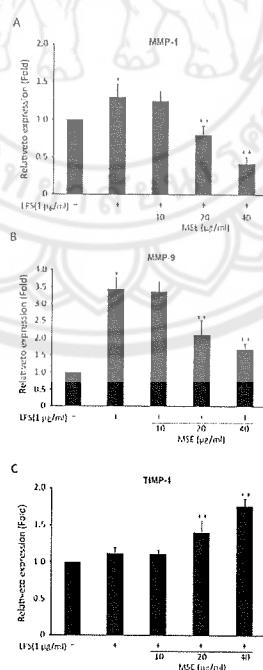


Figure 2: Modulation of *P. gingivalis* LPS induced MMP-1 (A), MMP-9 (B) and TIMP-1 mRNA expression by MSE. THP-1 cells were incubated with 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ MSE or 0.05% DMSO for 1 h, followed by 1 $\mu\text{g/ml}$ *P. gingivalis* LPS stimulation. After 24 h, cells were extracted for Real time PCR. Levels of MMP-1, MMP-9 and TIMP-1 mRNA were

normalized to GAPDH. The values (mean \pm SD) are the average of three independent experiments performed in triplicate; * indicates significant difference from the non-treated cells ($P < 0.05$); ** indicates significant difference from *P. gingivalis* LPS treatment alone.

MSE inhibits *P. gingivalis* LPS- induced MMP-1 and MMP-9 production

To further confirm the inhibitory effect of the MSE on MMP-1 and MMP-9 secretion, ELISA was used to detect the levels of these mediators in supernatants. MSE suppressed *P. gingivalis* LPS-induced MMP-1 and MMP-9 production in a concentration-dependent manner. MMP-1 and MMP-9 protein expression of *P. gingivalis* LPS treated THP-1 cells was significantly decreased ($P < 0.05$) by the both MSE testing concentrations [Figure 3].

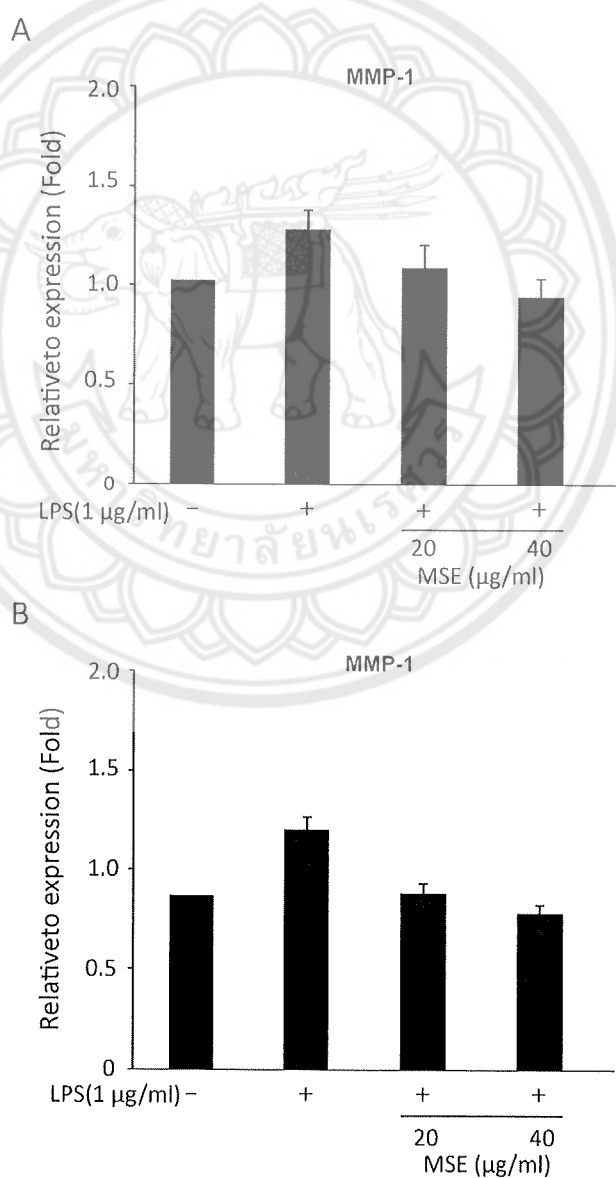


Figure 3: Modulation of *P. gingivalis* LPS induced MMP-1 (A) and MMP-9 (B) protein expression by MSE. THP-1 cells were incubated with 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ MSE or 0.05% DMSO for 1 h, followed by 1 $\mu\text{g/ml}$ *P. gingivalis* LPS stimulation. The culture supernatants were collected 24 h later. The amount of MMP-1 and MMP-9 protein expression were measured by ELISA. The values (mean \pm SD) are the average of three independent experiments performed in triplicate; * indicates significant difference from the non-treated cells ($P < 0.05$); ** indicates significant difference from *P. gingivalis* LPS treatment alone.

MSE inhibits *P. gingivalis* LPS-induced $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ degradation

To determine whether MSE inhibited the nucleus translocation of $\text{NF}\kappa\text{B}$ due to modulation of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ degradation, the levels of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ on the cytoplasmic extracts were examined. Initially, we investigated time-varying effects. As shown in Figure 4 A, *P. gingivalis* LPS stimulation induced gradually degradation of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ at 15 and 30 min. The $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ immunoreactivity reappeared at 60 min, presumably due to a feedback mechanism which regulated its own synthesis. Protein expression levels of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ were significantly lower at 30 and 60 min after *P. gingivalis* LPS stimulation ($P < 0.05$) compared to non-treated cells (Figure 4B). Preincubation with MSE at a concentration of 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ significantly inhibited $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ degradation stimulated by *P. gingivalis* LPS (Figure 4C and 4D).

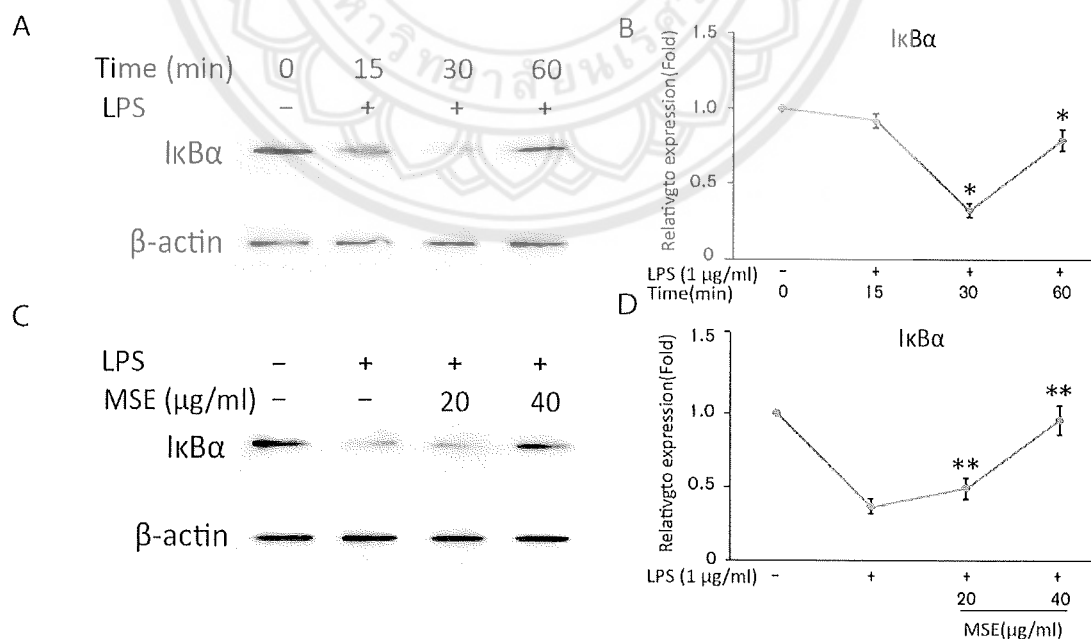


Figure 4: Inhibitory effect of MSE on the degradation of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. (A) THP-1 cells were treated with *P. gingivalis* LPS for the indicated times. (C) The cells were preincubated in the

absence or presence of 20 or 40 $\mu\text{g/ml}$ of MSE for 1 h, followed *P. gingivalis* LPS stimulation. The cytoplasmic extracts were prepared 30 min later and were then assayed by Western blot analysis for $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ and β -actin. (B and D) Quantitative analysis (mean \pm SD) of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ protein expressions. * indicates significant difference from the non-treated cells ($P < 0.05$); ** indicates significant difference from *P. gingivalis* LPS treatment alone.



CHAPTER V

DISCUSSION AND CONCLUSION

In this study, we evaluated the inhibitory effect of MSE on MMPs production in human monocytes involved in inflammatory processes. Our results are the first to demonstrate that 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ MSE significantly increased the mRNA and protein levels of MMP-1 and MMP-9. In addition, nontoxic concentration of MSE was able to enhance the gene expression of TIMP-1. To date, there is no published *report* on the effectiveness of MSE in MMPs and TIMPs expression, which make direct comparison difficult. Nonetheless, our findings of significantly decreased levels of MMP-1 and MMP-9 are in accordance with similar results in other studies on the different phenolic compounds. (Kou et al., 2008; Vilela et al., 2015). Kou et al. found that a dietary flavonoid, kaempferol inhibits *P. gingivalis*-induced mRNA expression of MMP-1 in human gingival cells (Kou et al., 2008). Recent studies have shown that caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component of propolis inhibit the production of MMP-1 and -9, while enhance the gene expression of TIMP-1 in LPS-activated human monocytes (Vilela et al., 2015).

TIMP-1 is considered to be the most important endogenous inhibitor of extracellular matrix degradation mechanism because it suppresses the activity of all MMPs, except for membrane-bound MMP (Lee et al., 2005). Vilela et al. demonstrated that the TIMP-1 gene expression level was significantly elevated by treatment with high concentration (60 mM) of CAPE (Vilela et al., 2015). In the present study, TIMP-1 expression was slightly increased after the exposure to the *P. gingivalis* LPS, then the level increased significantly after treatment with nontoxic concentration of MSE. Studies have shown that the addition of TIMP-1 significantly reduced the activity of MMP-1^[18] and MMP-9 (Vilela et al., 2015; Jin et al., 2005). Thus, the inhibition effect of MSE on MMP1 and MMP-9 activities was probably the result of reduced gene expression with consequent modifications of MMP1 and MMP-9 production and the activity of TIMP-1 which inhibited their activity.

NF κ B is pivotal for inflammatory mediators up-regulation resulting in inflammation and destruction of periodontal tissues (Ambili and Janam, 2017). Treatment with *P. gingivalis* LPS results in phosphorylation and subsequent loss of

cytoplasmic $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, which is an important event for $\text{NF}\kappa\text{B}$ activation. Oxyresveratrol has been previously reported to exert anti-inflammatory activity through inhibition of $\text{NF}\kappa\text{B}$ activation in LPS-activated murine macrophages (Chung et al., 2003). The present study shown that MSE might regulate inflammatory reactions in human monocytes by inhibiting *P. gingivalis* LPS-inducible $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ degradation and possibly suppress translocation of $\text{NF}\kappa\text{B}$ into nucleus. In addition to MMPs, $\text{NF}\kappa\text{B}$ regulates the production of various key proteins involved in triggering inflammation, including nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines. The inhibitory effects of MSE on $\text{NF}\kappa\text{B}$ activation suggest that it may exert a wide range of anti-inflammatory effects in human monocytes. However, since the THP-1 cells are malignant transformed cells, further study using untransformed cells and other signaling molecules are required to directly link to the physiological roles of MSE.

CONCLUSION

The present results show that MSE regulates the expression of MMP1, MMP-9, and TIMP-1 in *P. gingivalis* LPS-stimulated THP-1 cells by preventing the degradation of $\text{I}\kappa\text{B}$, consequently blocking the activation of $\text{NF}\kappa\text{B}$. These finding suggested that MSE may prevent periodontal tissue destruction from bacterial challenge by changing the balance of the production between MMPs and TIMPs.

REFERENCES

วิทยา บุญวรพัฒน์. สารานุกรมสมุนไพรไทย-จีน ที่ใช้บ่อยในประเทศไทย. หม่อน. สมาคมศาสตร์การแพทย์แผนจีนในประเทศไทย. 2011:618.

นิจศิริ เรืองรังษี, ธวัชชัย มังคละคุปต์. หนังสือสมุนไพรไทย เล่ม 1. หม่อน. บริษัทฐานการพิมพ์จำกัด, 2004:327.

Ambili R, Janam P. A critique on nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription 3: The key transcription factors in periodontal pathogenesis. J Indian Soc Periodontol 2017;21:350-6.

Cao Z, Li C, Xiang J. Effect of matrix metalloproteinase-1 promoter genotype on interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-1 production in human periodontal ligament cells. J Periodont Res 2010; 45: 109-15.

Chan E, WC, Lye PY, Wong SK. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. Chin J Nat Med 2016;14:17-30.

Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, *et al*. In-vitro and in-vivo anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. J Pharm Pharmacol 2003;55:1695-700.

Cifcibasi E, Kantarci A, Badur S, Issever H, Cintan S. Impact of metronidazole and amoxicillin combination on matrix metalloproteinases-1 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases balance in generalized aggressive periodontitis. Eur J Dent 2015;9:53-9.

Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. J Periodontol 2008; 79(8 Suppl): 1569-1576.

Darnay B.G., Haridas V., Ni J., Moore P.A., Aggarwal B.B. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. J Biol Chem. 1998;273:20551-5.

Darveau RP. The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. DNA Cell Biol. 2009;28:389-95.

Dong W, Xiang J, Li C, Cao Z, Huang Z. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer is associated with matrix metalloproteinase-1 and -2 in gingival tissues from patients with periodontitis. J Periodont Res 2009; 44: 125-32.

Feng Z., Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol* 2000.2006;40:50–76.

Franco C, Patricia HR, Timo S, Claudia B, Marcela H. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *Int J Mol Sci* 2017;18:440.

Geng Y, Zhang B, Lotz M. Protein tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of cytokines in human blood monocytes. *J Immunol*. 1993;151:6692–700.

Gölz L, Memmert S, Rath-Deschner B., Jäger A., Appel T., Baumgarten G., et al. Hypoxia and *P. gingivalis* Synergistically Induce HIF-1 and NF- κ B Activation in PDL Cells and Periodontal Diseases. *Mediators of Inflammation* 2015; DOI: 10.1155/2015/438085

Guan S., Shu L., Fu S., Liu B., Xu X., Wu J. *Prevotella intermedia* upregulates MMP-1 and MMP-8 expression in human periodontal ligament cells. *FEMS Microbiol Lett*, 299 (2009), pp. 214–22.

Gupta P. Natural Products as Inhibitors of Matrix Metalloproteinases. *Nat Prod Chem Res* 2016;4:1.

Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991;2:177-281.

Howard E., Bullen E., Banda M. Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Biol Chem* 1991;266:13064-69.

Ingman T, Sorsa T, Michaelis J, Konttinen YT. Matrix metalloproteinases-1, -3, and -8 in Adult periodontitis in situ. An immunohistochemical study. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:459-61.

Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 1127-32.

Islam S., Hassan F., Tumurkhuu G., Dagvadorj J., Koide N., Naiki Y., et al. Bacterial lipopolysaccharide induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 360:346–51.

Islam S., Hassan F., Tumurkhuu G., Ito H., Koide N., Mori I., et al. 5-Fluorouracil prevents lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells by inhibiting Akt-dependent nuclear factor- κ B activation *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;59:227–33.

Jacobs M, Harrison S. Structure of an I kappa B alpha/NF-kappa B complex. *Cell* 1998;95 :749-58.

Jang YJ, Kim ME, Ko SY. N-butanol extracts of *Panax notoginseng* suppress LPS-induced MMP-2 expression in periodontal ligament fibroblast and inhibit osteoclastogenesis by suppressing MAPK in LPS-activated RAW264.7 cells. *Arch Oral Biol* 2011;56:1319-27.

Jin UH, Chung TW, Kang SK, Suh SJ, Kim JK, Chung KH, *et al.* Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. *Clin Chim Acta* 2005;362:57-64.

Kim YM., Yun J, Lee CK., Lee H, Min K.R, Kim Y. Oxyresveratrol and Hydroxystilbene Compounds: inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J Biol Chem.* 2002;277:16340-4.

Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol* 2008;79:s1560-68.

Kou Y, Inaba H, Kato T, Tagashira M, Honma D, Kanda T, *et al.* Inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles are inhibited by hop-associated polyphenols. *J Periodontol* 2008;79:174-80.

Kumada H, Haishima Y, Umemoto T, Tanamoto K. Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 1995;177:2098-106.

Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology.* 1998;139:1338-1345.

Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998;93:165-76.

Lee JH, Chung JH, Cho KH. The effects of epigallocatechin-3-gallate on extracellular matrix metabolism. *J Dermatol Sci* 2005;40:195-204.

Lee S.E., Woo K.M., Kim S.Y., Kim H.M., Kwack K., Lee Z.H., *et al.* The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone.* 2002;30:71-7.

1021569

Lone BA. MMP-2 Expression in RAW 264.7 Cells, Down Regulated by Emodin Treatment. *Int J Interdiscipl Multidiscipl Stud* 2014;1:1-7.

Lorenz P, Roychowhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn T. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide*. 2003;9:64-76.

Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, de Sousa TS, Taba M, Jr, Teofilo JM, *et al*. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2010;37:180-90.

Nishihara T., Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology*, 2000. 2004;36:14-26.

O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontol* 2000. 2004;35:101-34.

Okonogi S, Duangrat C, Anuchpreeda S, Tachakittirungrod S, Chowwanapoonpohn S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chem*. 2007;103:839-46.

Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta* 2004;343:1-16.

Phoolcharoen W, Sooampon S, Sritularak B, *et al*. Anti-periodontal pathogen and anti-inflammatory activities of oxyresveratrol. *Nat Prod Commun*. 2003;8:1-4.

Rai B, Kaur J, Jain R, Anand SC. Levels of gingival crevicular metalloproteinases-8 and -9 in periodontitis. *Saudi Dent J* 2010;22:129-31.

Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B *et al*. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita* 2007;43:394-405.

Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997;14:158-72.

Socransky S. S., Haffajee A. D. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005;38:135-87.

Soonthornsit N, Hemstapat W, Utaisincharoen P, Pitaksuteepong T. Effect of *Morus Alba* stem extract on nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced Raw 264.7 macrophage cells. *Thai J Pharm Sci*. 2013;38 (Suppl.):69-71.

Soonthornsit N, Pitaksuteepong C, Hemstapat W, Utaisincharoen P, Pitaksuteepong P. In Vitro Anti-Inflammatory Activity of *Morus alba* L. Stem Extract in

LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. Evid Based Complement Alternat Med 2017 2017:3928956.

Sorsa T., Tjaderhane L., Konttinen Y.T., Lauhio A., Salo T., Lee H.M., et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. Ann Med. 2006;38:306–21.

Sritularak B, De-Eknamkul W, Likhitwitayawuid K. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. Thai J Pharm Sci. 1998;22:149–55.

Suda T., Nakamura I., Jimi E., Takahashi N. Regulation of osteoclast function. J Bone Miner Res. 1997;12:869–79.

Tanaka S., Takahashi N., Udagawa N., Tamura T., Akatsu T., Stanley E.R., et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. J Clin Invest. 1993; 91:257–263.

Tewtrakul S, Wattanapiromsakul C, Mahabusarakam W. Effects of compounds from *Garcinia mangostana* on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells. J Ethnopharmacol. 2009;121:379-82.

Tuter G., Kurtis B., Serdar M. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. J. Periodontol 2002;73:487-93.

Verma RP., Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs):chemical-biological functions and (Q)SARs. Bioorg Med Chem. 2007;15:2223-68.

Vilela P, de Oliveira JR, de Barros PP, Leao MV, de Oliveira LD, Jorgeln AO. In vitro effect of caffeic acid phenethyl ester on matrix metalloproteinases (MMP-1 and MMP-9) and their inhibitor (TIMP-1) in lipopolysaccharide-activated human monocytes. Arch Oral Biol 2015;60:1196-202.

Visse R., Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003;92:827–839.

Yhirayha C, Soontaranon S, Wittaya-Areekul S, Pitaksuteepong T. Formulation of lyotropic liquid crystal containing mulberry stem extract: influences of formulation ingredients on the formation and the nanostructure. Inter J Cosmet Sci, 2014;36:213–20.

Yiemwattana I, Chaisomboon N, Jamdee K. Antibacterial and anti-inflammatory potential of *Morus alba* stem extract. Open Dent J 2018;12:265-74.

Yiemwattana I, Kaomongkolgit R. Porphyromonas gingivalis LPS-induced IL-1 β and IL-8 Expression by Reducing MAPK Activation in THP-1 Cells. West Indian Med J. DOI: 10.7727/wimj.2016.081

Yun J.H., Pang E.K., Kim C.S., Yoo Y.J., Cho K.S., J.K. Chai, et al. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. J Periodontal Res. 2004;39: 300-7.

Weiss T, Shalit I, Blau H, Werber S, Halperin D, Levitov A, *et al.* Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on activated human monocytic cells: inhibition of NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase activation and of synthesis of proinflammatory cytokines. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1974-82.

WHO oral health Fact sheet N°318 April 2012. Geneva: World Health Organization; Available at: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/index.html>





ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมา

กิจกรรม	เดือน ปี พ.ศ.												
	ต.ค. 2560	พ.ย. 2560	ธ.ค. 2560	ม.ค. 2561	ก.พ. 2561	มี.ค. 2561	เม.ย. 2561	พ.ค. 2561	มิ.ย. 2561	ก.ค. 2561	ส.ค. 2561	ก.ย. 2561	ต.ค. 2561 - มี.ค. 2562
1. การเตรียมสารสกัดโคนต้นหม่อน - กิจกรรมที่วางแผนไว้ - กิจกรรมที่ดำเนินการมา	←→	←→											
2. การแยกและการเพาะเลี้ยง THP-1 cells ของมนุษย์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมา		←→											
3. การศึกษาการทำลายเซลล์ THP-1 หลังจากเติมไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อฟอร์โฟโรโมนเนส จิงจิवालิสและสารสกัดโคนต้นหม่อนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน - กิจกรรมที่วางแผนไว้ - กิจกรรมที่ดำเนินการมา			←→										
4. การวัดการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเก็บรหัสของ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-9 และตัวยับยั้งฤทธิ์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 ในเซลล์ THP-1 ด้วยเครื่องขยายจำนวนสารพันธุกรรมแบบเวลาจริง - กิจกรรมที่วางแผนไว้ - กิจกรรมที่ดำเนินการมา					←→								
5. การวัดการแสดงออกของโปรตีนเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-1 เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-9 จากเซลล์ THP-1 ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนแอสเสย์ - กิจกรรมที่วางแผนไว้ - กิจกรรมที่ดำเนินการมา								←→					
6. ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อส่งสัญญาณในเซลล์ THP-1 - กิจกรรมที่วางแผนไว้ - กิจกรรมที่ดำเนินการมา									←→				



RESEARCH ARTICLE

Antibacterial and Anti-inflammatory Potential of *Morus alba* Stem ExtractIchaya Yiemwattana^{1*}, Niratcha Chaisomboon² and Kusuma Jamdee²¹Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand²Research Laboratory, Faculty of Dentistry, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

Received: September 7, 2017

Revised: March 05, 2018

Accepted: March 14, 2018

Abstract:**Background:**

Periodontitis, a chronic inflammatory disease, is the leading cause of tooth loss in adults. Evidence for the anti-inflammatory activity of *M. alba* Stem Extract (MSE) in periodontal disease is limited.

Objective:

The study aimed to investigate the inhibitory effect of MSE on the growth of periodontopathic bacteria and expression of interleukin (IL)-6 and IL-8 in *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human Periodontal Ligament (hPDL) fibroblasts.

Methods:

The antimicrobial activities of MSE were tested against *P. gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by the disk diffusion, the minimum inhibitory concentration and the minimal bactericidal concentration methods. Cytotoxicity of *P. gingivalis* LPS and MSE on hPDL fibroblasts was determined by MTS assay. The expression of cytokines (IL-6 and IL-8) mRNA and proteins in hPDL fibroblasts was measured using the reverse transcription-qPCR and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

Results:

MSE exhibited antibacterial activities against *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* with the zones of inhibition of 10.00 ± 0.33 mm and 17.33 ± 0.58 mm, respectively. MIC and MBC values for MSE against *P. gingivalis* were 62.5 µg/ml. The MIC and MBC values against *A. actinomycetemcomitans* were 250 µg/ml and 500 µg/ml, respectively. *P. gingivalis* LPS was shown to mediate the expression of pro-inflammatory cytokines in hPDL fibroblasts. However, treatment with MSE concentrations of 2.5 and 5.0 µg/ml significantly suppressed *P. gingivalis* LPS-induced IL-6 and IL-8 mRNA and protein expression ($p < 0.05$).

Conclusion:

The present study demonstrates that MSE has antibacterial activity against two putative periodontal pathogens. MSE suppressed IL-6 and IL-8 expression in *P. gingivalis* LPS-stimulated hPDL fibroblasts, indicating a possible anti-inflammatory effect. Thus, it is a potential adjunctive agent for the treatment of periodontitis.

Keywords: *Morus alba* L., Interleukin (IL)-6 and IL-8, Lipopolysaccharide, PDL fibroblasts, Inflammatory cytokines, Periodontal diseases.

1. INTRODUCTION

Periodontitis is characterized by inflammatory destruction of the supporting tissues of the teeth [1]. The etiology

* Address correspondence to this author at the Ichaya Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Naresuan University, 99 Moo 9, Phitsanulok-Nakemsawan Road, TambonThu Pho, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand. Tel: +665 966895, Fax: +665 966053, Email: ichayak@yahoo.com

of this disease is related to uncontrolled bacterial pathogen-host interactions, resulting in the alteration of resident cells in the periodontium [2]. A few Gram-negative bacterial species have been specifically associated with periodontitis, including *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [3]. *P. gingivalis* Lipopolysaccharide (LPS) is one of the key virulent attributes, which is significantly involved in periodontal pathogenesis [4, 5]. *P. gingivalis* LPS acts as a potent stimulus to a variety of host cells, which subsequently results in the expression of inflammatory cytokines leading to the development and progression of the related host immune response in periodontal diseases [6].

Human Periodontal Ligament (hPDL) fibroblasts, the primary cultured cell of the ligament, are responsible for the formation, repair and maintenance of the extracellular matrix of the hPDL. These cells are involved in inflammatory and immune processes leading to cytokine (*i.e.*, interleukin (IL)-1 or IL-6) or chemokine (*i.e.*, IL-8) release which could further enhance inflammation [7, 8] and finally leading to periodontal destruction via Matrix Metalloproteinases (MMPs) [9]. IL-6 is a proinflammatory mediator that activates host cells and in turn, leads to bone resorption [10]. IL-8 is a chemokine produced by a variety of tissues and blood cells, and it is a potent inducer of neutrophil chemotaxis following activation in inflammatory regions [11]. *P. gingivalis* LPS has been shown to stimulate the production of IL-6 and IL-8 by hPDL fibroblasts [12, 13], suggesting that these mediators are involved in the pathogenesis of periodontitis.

Morus alba L., also known as mulberry or Mhon in Thai has been widely cultivated in Thailand, particularly for the leaves to feed silkworms. Its leaves, fruit and bark have long been used in traditional medicine for the treatment of fever, improvement of eyesight, joint strengthening and lowering blood pressure [14]. The amount of oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene), a natural chemical compound found in *M. alba* extract, in various parts of mulberry tree, is different and the ethanolic extract obtained from stems has the highest amount of this bioactive compound oxyresveratrol compared to the extract obtained from twigs, with the least amount in the leaves [15]. It has been reported that oxyresveratrol from *M. alba* possesses anti-oxidative and radical scavenging activities. It has also been reported to have anti-inflammatory activity by inhibiting the production of nitric oxide and prostaglandin E₂, Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) expression, and NF- κ B activity in the LPS-activated RAW 264.7 macrophage cells [16]. In addition, *M. alba* stem extract can inhibit nitric oxide production via suppression of both the iNOS mRNA and protein. It was also found to inhibit the expression of COX-2 mRNA in LPS-induced RAW 264.7 cells [15]. The other components in MSE such as prenylated flavonoids (*i.e.* kuwanon E) may have anti-inflammatory activity through the inhibition of NO production [17]. However, the anti-inflammatory activity of MSE in hPDL fibroblasts and antibacterial activity have not yet been determined. Therefore, this study aimed to investigate the inhibitory effect of MSE on the growth of periodontopathic bacteria and expression of IL-6 and IL-8 in *P. gingivalis* LPS-stimulated hPDL fibroblasts.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Materials and Preparation of Plant Extract

M. alba stems were obtained from the Queen Sirikit Sericulture Center, Tak Province, Thailand. The fresh stems were chopped and dried. Then, the dried plant was extracted by maceration technique using 80% ethanol for 2 cycles at room temperature. The crude extract was filtered through 0.45 μ m pore size nylon membrane (VertiClean™, Vertical Chromatography Co., Ltd., Bangkok, Thailand). After filtration, the filtrate was evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator (BUCHI Rotavapor R-114, Switzerland) and continued drying using a water bath (M25 LAUDA, Germany). Then, the dried powder was stored in a tight, light-protected container. The dried crude extract was dissolved in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) to give a concentration of 100 mg/ml as a stock solution for the determination of antibacterial activity and anti-inflammatory activity of MSE.

2.2. Bacteria and Culture Conditions

P. gingivalis strain ATCC 35277 and *A. actinomycetemcomitans* strain ATCC 29523 were obtained from the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA. *P. gingivalis* was grown anaerobically at 37°C in an anaerobic chamber under an atmosphere of 80% nitrogen: 10% carbon dioxide: 10% hydrogen. Culture media was ATCC medium 2722 supplemented tryptic soy broth/agar. Tryptic Soy Broth (TBS) Blood Agar Plates (BAP) supplemented per liter were made with the addition of 30.0 g of TBS (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), 5.0 g of yeast extract (BD), 0.5 g of L-cysteine hydrochloride (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India), and 15.0 g of agar. Vitamin K1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and hemin (Sigma) were added to give the final concentrations of 1.0 μ g/ml and 5 μ g/ml, then the medium was autoclaved for 15 min at 121°C. The medium was

cooled down to 50°C and horse blood was added in the final concentration of 5% (Oxoid Limited, Cheshire, England). The bacteria were inoculated from BAP into 5 ml of TSB and cultured anaerobically for 18 to 24 h at 37°C, then diluted in the TSB and grown overnight to reach early log phase. *A. actinomycetemcomitans* was grown at 37°C under an atmosphere of 5% carbon dioxide. Culture media was made with 37 g of Brain Heart Infusion (BHI) broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) and 15.0 g of BHI agar. The medium was autoclaved for 15 min at 121°C. Bacteria were inoculated from BHI agar into 5 ml of BHI and cultured for 18 to 24 h at 37°C, 5% CO₂, then diluted in BHI and grown overnight to reach an early log phase. Bacterial cells were harvested by low-speed centrifugation (4,000 rpm 5 min), washed, and resuspended in 1 ml Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.2. The concentration of bacteria was determined with a spectrophotometer at an optical density of 625 nm (OD 0.08-0.1 = 1-2x10⁸ cfu/ml).

2.3. Determination of Antibacterial Activity

The antibacterial activity of MSE was evaluated using a disc diffusion method on an agar medium. *P. gingivalis* was grown on anaerobic TSB blood agar plates in an anaerobic environment at 37°C for 3-5 days. *A. actinomycetemcomitans* was grown in brain heart infusion agar plate to 5% CO₂ at 37°C for 1-2 days. The MSE stock solution was diluted to 12.5-100 mg/ml at a final concentration and introduced onto the disc and allowed to dry. Then, the disc was impregnated onto the seed agar plate. DMSO was used as a negative control, whereas 0.2% chlorhexidine was used as a positive control. The tests were performed in triplicate. The antibacterial activity was determined based on the diameter of the zone of inhibition.

A broth dilution technique was used to determine the antibacterial activity of MSE (Jorgensen and Turnidge, 2007). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values of MSE were determined. From MSE stock solution, serial two-fold dilutions (15,625-2,000 µg/mL) were prepared with 1 ml volume with TSB for *P. gingivalis* and 1 ml volume with BHI for *A. actinomycetemcomitans*. Subsequently, each bacterial strain suspension with a final inoculum of 1x10⁶ bacteria/ml was added to the tubes with different dilutions of MSE. The negative control was prepared using 2% DMSO as was maximum concentration was used to dissolve the extracts in antibacterial experiments. Positive control was prepared using 0.2% chlorhexidine. Solvent and medium controls were used for reference. After 24 h incubation, the bacterial growth was observed for turbidity. MIC was defined as the lowest concentration present in a clear well with no turbidity by visual inspection. The MBC assay was performed continuously after MIC assay. An aliquot of 100 µl from dilution tubes without turbidity was inoculated on TSB blood agar plates for *P. gingivalis* and inoculated on BHI agar plate for *A. actinomycetemcomitans*. The plates were then incubated for the appearance of bacterial growth for 3-5 days. The MBC was determined by the lowest concentration of the crude extract that showed no viable growth on the agar plate. The tests were performed in triplicate.

2.4. Preparation and Culture of hPDL Fibroblasts

This study was approved by the Naresuan University Institutional Review Board (COA No. 013/2015). hPDL fibroblasts were harvested from caries-free and periodontally healthy teeth extracted for orthodontic reasons with informed consent. After extraction, the teeth were rinsed with PBS several times. After getting rinsed, the periodontal ligament tissues attached to the medial part of the root were removed using a curette. The tissue explants were plated in 35-mm tissue culture dishes and grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Hyclone, South Logan, UT, USA) with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone), 2 mM L-glutamine (Hyclone), 100 U/mL penicillin (Hyclone) and 100 µg/mL streptomycin (Hyclone) at 37°C, with 5% CO₂ and 95% humidity. After reaching confluence, the hPDL fibroblasts were detached with 0.25% Trypsin-EDTA (Hyclone). The cells between the 3rd and 5th passage were used in the following studies. Three independent experiments with cells from 3 different individuals were performed in each experiment.

2.5. Cell Viability Assays

hPDL fibroblasts were seeded into 24-well culture plates at 5 X10⁴ cells per well in DMEM supplemented with 10% FBS for 24h. Then, the medium was replaced with serum-free medium and the cells were treated with various concentrations of MSE or *P. gingivalis* LPS (InvivoGen, San Diego, CA, USA) in serum-free medium for 24 h. The viability of hPDL fibroblasts towards extracts from *M. alba* stem was then measured using the Cell Titer 96 aqueous one solution cell proliferation kit following the manufacturer's instructions (MTS assay; Promega, Madison, WI, USA). MTS working solution was added to each well and incubated for 5 min at 37°C. After transferring 200 µl of supernatant to a 96-well plate, the soluble formazan absorbance was recorded using a plate reader at 490 nm. All measurements

were performed in triplicate and were repeated on three different occasions ($n = 3$). Cytotoxicity was calculated by expressing absorbance values as a percentage of control values (100% represented zero cytotoxicity).

2.6. Quantification of Cytokines mRNA by Reverse Transcription Real-Time PCR

hPDL fibroblasts were seeded in a 6-well plate at a density of 5×10^5 cells per well. Following 1 h of incubation with 1.25, 2.5, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ MSE or 0.05% DMSO, the cells were stimulated with 10 $\mu\text{g/ml}$ *P. gingivalis* LPS for 23 h. Total RNA was then isolated by Nucleospin RNAII (Macherey-Nagel GmbH&Co. KG) according to the manufacturer's instruction. Concentration and purity of RNA were determined using a Nano Drop ND-2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA). cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA and mixed with LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master (Roche). Two-step quantitative reverse transcription PCR was performed in duplicate using the LightCycler 480 II Real-Time PCR System (Roche). The hot start enzyme was activated (95 °C for 5 min), and cDNA was then amplified for 40 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 20 s and annealing/extension at 60 °C for 20 s. A melt curve assay was then performed (65 °C for 1 min and then the temperature was increased by 1.1 °C every 10 s) to detect the formation of primer-derived trimers and dimers. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a control. The sequences of the PCR primers were used as follows: IL-6, (forward) 5'-CCTGAACCTTCCAAAGATGGC-3', and (reverse) 5'-CTGACCAGAAGAAGGAATGCC-3' [13]; IL-8, (forward) 5'-CGATGTCAGTGCATAAAGACA-3', and (reverse) 5'-TGAAATTCAGCCCTCTTCAA-3' [13]; and GAPDH, (forward) 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT-3', and (reverse) 5'-TCACACCCATGACCGAACATGG-3' [13]. Data were analyzed with the Light Cycler[®] 480 software version 1.5. The average starting quantity of fluorescence units was used for the analysis. Quantification was calculated by using GAPDH for internal control.

2.7. Measurement of IL-6 and IL-8 Concentrations by ELISA

After hPDL fibroblasts were stimulated with 10 $\mu\text{g/ml}$ *P. gingivalis* LPS and treated with MSE for 24 h, the supernatants were collected and the levels of IL-6 and IL-8 protein were measured using the human IL-6 and IL-8 ELISA kits according to the manufacturer's protocol (BioLegend, San Diego, CA, USA). The optical density of each well at 450 nm was determined using a microplate reader (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA). All measurements were performed in duplicate and repeated at three different occasions. The mean values of the two measurements were used for statistical analysis.

2.8. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software version 19.0. All data were expressed as the mean \pm Standard Deviation (SD). Differences between the experimental groups were analyzed with the analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc Tukey test in all experiments. The differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Growth Inhibition of Periodontopathic Bacteria by MSE

Two putative periodontal pathogens were selected for the antibacterial analysis. As shown in Table 1, the disc diffusion analysis revealed that 50 $\mu\text{g/ml}$ MSE showed antibacterial activity against *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* with inhibition zones of 10.00 ± 0.33 mm and 17.33 ± 0.58 mm, respectively. The positive control, 0.2% chlorhexidine, showed an inhibition zone of 10.33 ± 0.58 mm and 18.33 ± 0.58 mm against the strains of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, respectively. Next, MIC and MBC of MSE against these two periodontal pathogens were employed by broth dilution technique to evaluate their antibacterial strength. As reported in Table 2, the MIC indicated bacteriostatic concentration against *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* in the average value of 62.5 $\mu\text{g/ml}$ and 250 $\mu\text{g/ml}$, respectively. MSE showed potentially bactericidal activity against *P. gingivalis* with an MBC of 62.5 $\mu\text{g/ml}$ while an MBC of *A. actinomycetemcomitans* reached to 500 $\mu\text{g/ml}$. On the other hand, MIC and MBC values of 0.2% chlorhexidine against both pathogenic bacteria were found to be effective with a concentration of 1.25 $\mu\text{g/ml}$ and 2.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The results obtained from three repetitions for each bacterium were similar.

Table 1. Inhibition zone of MSE against periodontal pathogens.

Periodontal Pathogens	Zone of Inhibition (mm)	
	50 mg/ml MSE	0.2% Chlorhexidine
<i>P. gingivalis</i>	10.00 ± 0.33	10.33 ± 0.58
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	17.33 ± 0.58	18.33 ± 0.58

Data are means of three replicates (n = 3) ± standard error

Table 2. MICs and MBCs of MSE against the periodontal pathogens.

Periodontal Pathogens	MIC (µg/ml)		MBC (µg/ml)	
	MSE	0.2% Chlorhexidine	MSE	0.2% Chlorhexidine
<i>P. gingivalis</i>	62.5	1.25	62.5	2.5
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	250	1.25	500	2.5

3.2. Cell Viability of hPDL Fibroblasts Treated With MSE

Initially, we investigated the possible cytotoxic effects of *P. gingivalis* LPS and MSE by treating hPDL fibroblasts with different concentrations of *P. gingivalis* LPS or MSE (0, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 µg/ml) for 24 h followed by MTS assay. Dose-dependent adverse effects of *P. gingivalis* LPS and MSE on the viability of hPDL fibroblast were detected. *P. gingivalis* LPS tested here showed no effect on hPDL fibroblasts viability (Fig. 1a). MSE at a concentration between 0 and 5.0 µg/ml was not toxic to hPDL fibroblasts as the cell viability was not significantly altered compared to the non-treated control. However, at the concentration of 10 to 20 µg/ml, cell viability significantly decreased indicating that cells died at these concentrations (Fig. 1b). Thus, MSE was used at less than 5.0 µg/ml for following experiments.

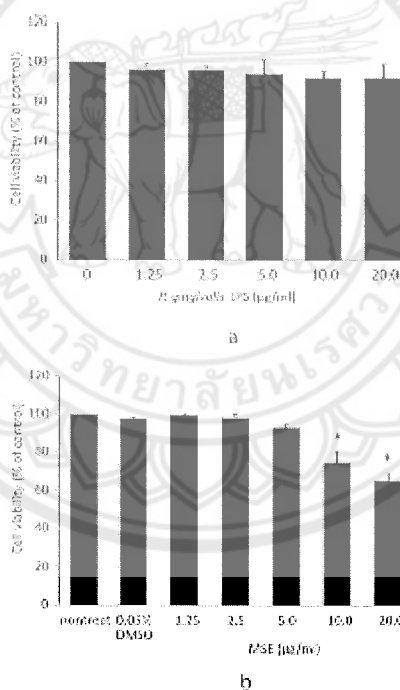


Fig. (1). Effect of *P. gingivalis* LPS (a) and MSE (b) on cell viability in hPDL fibroblasts. Cells were treated with various concentrations and cell viability was measured by MTS assay at 24 h after culture. The data are expressed as the percentage of viable cells compared with the nontreated cells. The values (mean ± SD) are the average of three independent experiments performed in triplicate; * indicate significant ($p < 0.05$).

3.3. Inhibition of the LPS-Induced Expressions of IL-6 and IL-8 mRNA by MSE

In order to investigate the inhibitory effect of MSE on *P. gingivalis* LPS-induced IL-6 and IL-8 mRNA expression, reverse transcription q-PCR was performed. hPDL fibroblasts were treated with MSE for 1 hour prior to stimulation with *P. gingivalis*-LPS for 24 h. The results showed that MSE inhibited gene expression of IL-6 and IL-8 in a dose dependent manner compared to fibroblasts untreated with MSE. The concentrations 2.5 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$ significantly ($p < 0.05$) inhibited the expression of both IL-6 (Fig. 2a) and IL-8 (Fig. 2b) mRNA compared to cells treated with *P. gingivalis* LPS alone. These results suggest that the inhibitory effect of MSE on *P. gingivalis* LPS-induced IL-6 and IL-8 mRNA expression was regulated at the transcription.

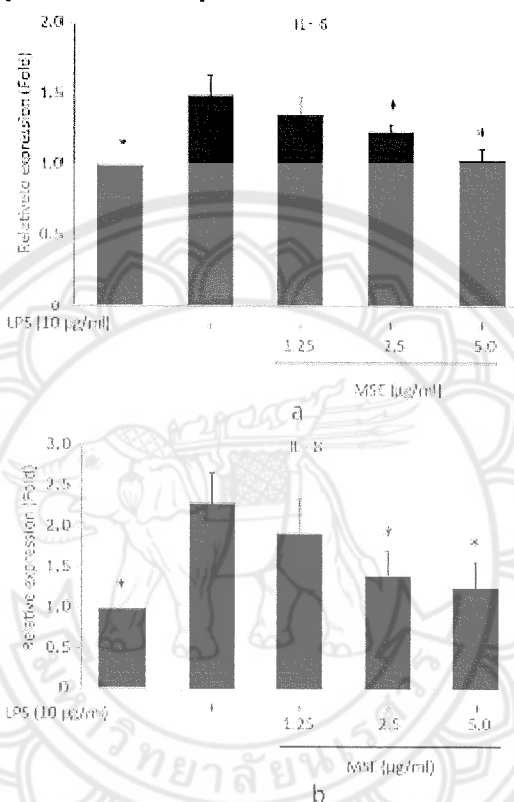


Fig. (2). MSE suppressed IL-6 (a) and IL-8 (b) mRNA expression in hPDL fibroblasts. Cells were incubated with 1.25, 2.5 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$ MSE or 0.05% DMSO for 1 h, followed by 10 $\mu\text{g/ml}$ *P. gingivalis* LPS stimulation. After 24 h, cells were extracted for Real-time PCR. Levels of IL-6 and IL-8 mRNA were normalized to GAPDH. The values (mean \pm SD) are the average of three independent experiments performed in triplicate; *indicate significant difference from *P. gingivalis* LPS treatment only ($p < 0.05$).

3.4. MSE Inhibits LPS Induced IL-6 and IL-8 Production

To further confirm the inhibitory effect of the MSE on IL-6 and IL-8 secretion by *P. gingivalis* LPS-stimulated hPDL fibroblasts, ELISA was used to detect the levels of these cytokines in supernatants. For IL-6, the significantly ($p < 0.05$) lower cytokine concentrations compared to the cells treated with *P. gingivalis* LPS were detected after incubation with 1.25, 2.5 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$ MSE (Fig. 3a). However, IL-8 levels showed a significant decrease in the cells incubated with 2.5 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$ MSE compared to the cells treated with *P. gingivalis* LPS alone (Fig. 3b). MSE suppressed *P. gingivalis* LPS induced IL-6 and IL-8 production in a concentration-dependent manner. These findings indicated that MSE could also inhibit the expression of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 at the protein levels.

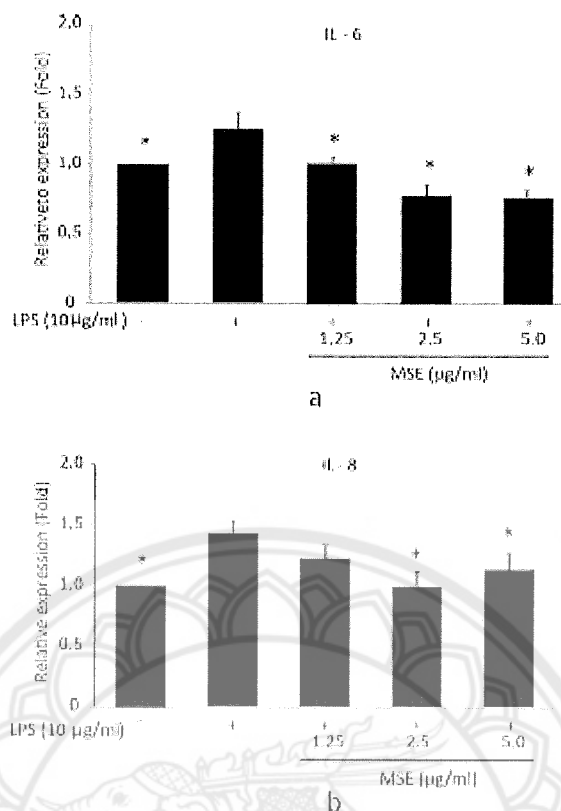


Fig. (3). MSE suppressed IL-6 (a) and IL-8 (b) secretion in hPDL fibroblasts. Cells were incubated with 1.25, 2.5 and 5.0 µg/ml MSE or 0.05% DMSO for 1 h, followed by 10 µg/ml *P. gingivalis* LPS stimulation. The culture supernatants were collected 24 h later. The amount of IL-6 and IL-8 protein expression were measured by ELISA. The values (mean ± SD) are the average of three independent experiments performed in triplicate. * indicates significant difference from *P. gingivalis* LPS treatment only ($p < 0.05$).

4. DISCUSSION

The present study shows for the first time that the addition of MSE inhibited the growth of periodontal pathogens and reduced the expression of pro-inflammatory cytokines by hPDL fibroblasts stimulated by *P. gingivalis* LPS. *M. alba* stem extract is one of the important natural sources of oxyresveratrol, which has been reported to possess numerous pharmacological properties, especially its anti-inflammatory [15], hypoglycemic [18], antioxidant [18, 19], and anti-microbial activities [19].

Our results showed that MSE possesses antibacterial activities against two major bacterial causes of periodontitis, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*. However, *P. gingivalis* showed more sensitivity to MSE than *A. actinomycetemcomitans*. According to the literature reports, we presume that the main active substance which contributed to the antibacterial and anti-inflammation activities could be oxyresveratrol. A previous report has indicated that oxyresveratrol from *Asiocarpus lakoocha* [13] and *M. alba* leaf extract exhibited antibacterial activities against *P. gingivalis* as well as *A. actinomycetemcomitans* [20]. *P. gingivalis* was reported to be the most sensitive organism against *M. alba* leaf extract with an MIC value of 1.95 mg/ml, while *A. actinomycetemcomitans* was less sensitive with an MIC value of 3.91 mg/ml [18]. Our results are in accordance with the previous studies reported the inhibitory effect of *M. alba* extract on these two Gram-negative bacteria with variation in MIC and MBC values. A variation in the sensitivities of these plant extracts may be due to variation in the method of extraction, bioactive compounds as well as bacterial strains used, and variation in chemical constituents. However, the present study only evaluated antibacterial activity against the selected pathogens in planktonic but not in a biofilm state. A complex biofilm composed of multiple species is generally more resistant to antimicrobial agents than planktonic cells [21]. The diversity and metabolic state of microorganisms in a subgingival biofilm play key roles in antibiotic resistance and the inability of the bacterial community to be phagocytized by host inflammatory cells, eventually leads to periodontal disease. Further studies on

the potential of MSE to control the growth of periodontal pathogens in biofilm state are necessary to clarify its effects.

IL-6 and IL-8 are important cytokines involved in the immune responses against infection, but overexpression of these cytokines might cause inflammatory diseases, including periodontal diseases [22]. Previous studies have reported that *P. gingivalis* LPS stimulated the production of pro-inflammatory cytokines secreted from human gingival fibroblasts [23, 24]. In the present study, it was also found that *P. gingivalis* LPS stimulation increased the expression of IL-6 and IL-8 from hPDL fibroblasts in both mRNA and protein levels. The results showed that MSE extracts inhibited the secretion of IL-6 and IL-8 from *P. gingivalis* LPS-induced hPDL fibroblasts in a dose-dependent manner. A recent study has reported that MSE demonstrated anti-inflammatory activity through the inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [15]. Consistent with the previous studies, the reduced levels of *P. gingivalis* LPS-induced expression of inflammatory cytokines in the present study indicated that MSE tested here may have potent anti-inflammatory effects. The effective concentration of MSE for anti-inflammatory activity is 2.5 µg/ml. This concentration did not affect the hPDL fibroblasts viability at 24 h, suggesting the primary effect is the suppression of cytokine production rather than cytotoxicity. However, the MIC of the extract against *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* was 62.5 µg/mL and 250 µg/mL, respectively. These concentrations induced cytotoxic effects in hPDL fibroblasts in 24 h. Therefore, further investigations of the anti-inflammatory effects of MSE and signaling pathways related to inflammation in hPDL fibroblasts or other oral cells as well as time-kill assays on the periodontopathic bacteria are needed to define the optimal concentration for clinical application.

CONCLUSION

The present results show that MSE has an anti-bacterial potential against the two putative periodontal pathogens. In addition, MSE can inhibit *P. gingivalis* LPS-induced production of the pro-inflammatory cytokines, IL-6 and IL-8 expression by hPDL fibroblasts. These findings indicate that MSE may be used as an adjunctive agent for periodontal treatment, but these observations require further experimental verification of the effects.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

This study was approved by the Naresuan University Institutional Review Board (COA No. 013/2015).

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals were used in this research. All research procedures followed were in accordance with the ethical standards of the committee responsible for human experimentation (institutional and national), and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2005.

CONSENT FOR PUBLICATION

Written informed consent was obtained from the patient for publication of this study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Associate Professor Tasana Pitaksuteepong, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand, for kindly providing MSE. This study was supported by Naresuan University Research Grant (R2560C081; fiscal year 2016).

REFERENCES

- [1] Fleming TF. Periodontitis. *Ann Periodontol* 1999; 4(1): 32-8. (<http://dx.doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.32>) [PMID: 10863373]
- [2] Cekici A, Kaurarci A, Hasnurk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 2014; 64(1): 57-89. (<http://dx.doi.org/10.1111/prd.12002>) [PMID: 24320956]
- [3] Fekrisrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; 366(9499): 1809-20.

- ([http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8)) [PMID: 16298220]
- [4] Bainbridge BW, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: An unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand* 2001; 59(3): 131-8. (<http://dx.doi.org/10.1080/000163501750266710>) [PMID: 11501881]
- [5] Lu Q, Darveau RP, Samaranyake LP, Wang CY, Jin L. Differential modulation of human beta-defensins expression in human gingival epithelia by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide with tetra- and penta-acylated lipid A structures. *Innate Immun* 2009; 15(6): 325-35. (<http://dx.doi.org/10.1177/1753425909104889>) [PMID: 19675119]
- [6] Ren L, Leung WK, Darveau RP, Jin L. The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membrane-bound CD14, and toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2005; 76(11): 1950-9. (<http://dx.doi.org/10.1902/jop.2005.76.11.1950>) [PMID: 16274315]
- [7] Konemann A, Stabenow D, Knolle PA, Held SAE, Deschner J, Jäger A. Regulatory role of periodontal ligament fibroblasts for innate immune cell function and differentiation. *Innate Immun* 2013; 19(5): 745-52. (<http://dx.doi.org/10.1177/1753425912440588>) [PMID: 22438844]
- [8] Takashiba S, Naitoh K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: Fibroblast biology. *J Periodontol* 2003; 74(1): 103-10. (<http://dx.doi.org/10.1902/jop.2003.74.1.103>) [PMID: 12393804]
- [9] Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 2003; 31: 77-104. (<http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0757.2003.03105.x>) [PMID: 12656997]
- [10] Prashaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol* 2011; 38(Suppl. 11): 60-84. (<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x>) [PMID: 21323705]
- [11] Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, et al. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol* 1995; 155(3): 1438-33. [PMID: 7636308]
- [12] Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozinski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. *Braz Oral Res* 2011; 25(2): 157-62. (<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242011000200010>) [PMID: 21537641]
- [13] Phoolcharoen W, Soeamporn S, Sritularak B, Likhitwinyawand K, Kuvatanasuchari J, Pavasant P. Anti-periodontal pathogen and anti-inflammatory activities of oxyresveratrol. *Nat Prod Commun* 2008; 3(5): 1-4.
- [14] Chan EWC, Lye PY, Wong SK. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. *Chin J Nat Med* 2016; 14(1): 17-30. [PMID: 26850343]
- [15] Soonthornat N, Pitakutshepong C, Hemstapat W, Uminicharoen P, Pitakutshepong T. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Morus alba* L. stem extract in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017; 2017: 3928956. (<http://dx.doi.org/10.1155/2017/3928956>) [PMID: 28684986]
- [16] Chung KO, Kim BY, Lee MH, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55(12): 1695-700. (<http://dx.doi.org/10.1211/0022357032313>) [PMID: 14738598]
- [17] Yang ZG, Matsuzaki K, Takamitsu S, Kitanaka S. Inhibitory effects of constituents from *Morus alba* var. *multicaulis* on differentiation of 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW264.7 cells. *Molecules* 2011; 16(7): 6010-21. (<http://dx.doi.org/10.3390/molecules16076010>) [PMID: 21772233]
- [18] Alnazi AS, Anwar MJ, Alam MN. Hypoglycemic and antioxidant effect of *Morus alba* L. stem bark extracts in Streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Appl Pharm* 2017; 9: 234. (<http://dx.doi.org/10.21065/1920-4159.1000234>)
- [19] Wang W, Zu Y, Fu Y, Effarth T. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of extracts from *Morus alba* L. leaves, stems and fruits. *Am J Chin Med* 2012; 40(2): 349-55. (<http://dx.doi.org/10.1142/S0192415X12500279>) [PMID: 22419428]
- [20] Gunjal S, Ankole AV, Bhat K. *In vitro* antibacterial activity of ethanolic extract of *Morus alba* leaf against periodontal pathogens. *Indian J Dent Res* 2015; 26(5): 533-6. (<http://dx.doi.org/10.4103/0970-9290.172082>) [PMID: 26672427]
- [21] van der Veen S, Abee T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and paracetic acid. *Int J Food Microbiol* 2011; 144(3): 421-31. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.029>) [PMID: 21084128]
- [22] Fujita Y, Ito H, Sekino S, Numabe Y. Correlations between pentraxin 3 or cytokine levels in gingival crevicular fluid and clinical parameters of chronic periodontitis. *Odentology* 2012; 100(2): 215-21. (<http://dx.doi.org/10.1007/s10266-011-0042-1>) [PMID: 21932007]
- [23] Instani T, Kato T, Okuda K. Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of

- Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16(2): 65-72.
(<http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-302x.2001.01602065.x>) [PMID: 11240333]
- [24] Yiemwattana I, Kaewongkolgir R. Alpha-mangosetin suppresses IL-6 and IL-8 expression in *P. gingivalis* LPS-stimulated human gingival fibroblasts. *Odontology* 2015; 103(3): 343-55.
(<http://dx.doi.org/10.1007/s10266-014-0160-7>) [PMID: 24283491]

© 2018 Yiemwattana *et al.*

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International Public License (CC-BY 4.0), a copy of which is available at: (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>). This license permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.





ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางอิชยา เยี่ยมวัฒนา
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs Ichaya Yiemwattana
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 6499 00030 96 5
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000

โทร 055-966062 โทรสาร 055-966063

e-mail: ichayak@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
พ.ศ. 2538	ตรี	ท.บ. ทันตแพทยศาสตร์ บัณฑิต	-	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
พ.ศ. 2544	โท	วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต	ปริทันตวิทยา	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
พ.ศ. 2555	เอก	วิทยาศาสตร์ ดุษฎีบัณฑิต	ชีววิทยา ช่องปาก	มหาวิทยาลัยนเรศวร	ไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Periodontology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

1. ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารนิโคตินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคน จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ ปี 2548

2. การศึกษาบทบาทของ Nck Adaptor ในด้านการเกิดอะพอพโตซิสของทีเซลล์ของมนุษย์ จากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2551

3. บทบาทของโมเลกุล Nck1 ในการทำงานของ T cell receptor จากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2554

4. ผลของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อการผลิตอินเตอร์ลิวคิน-6 และอินเตอร์ลิวคิน-8 โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากเนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์ จากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2558

5. การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดโคนต้นหม่อน จากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2560

6. ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่อการแสดงออกของเอ็มเอ็มพี-1 เอ็มเอ็มพี-2 และ เอ็มเอ็มพี-9 จากการกระตุ้นด้วยด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิวาลิส และการ กำเนิดของเซลล์สลายกระดูก จากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2561

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง

1. อธิยา เขียววัฒนา. การเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยาและทางคลินิกหลังใช้หัวชุดหินน้ำลาย อัลตราโซนิคส์คล้ายควอเตอร์แบบมินิทีป. ว. ทันต จุฬา. 2549;29:22-32.
2. Yiemwattana I, Ngoenkam J, Paensuwan P, Kriangkrai R, Chuenjittkuntaworn B, Pongcharoen S. Essential role of the adaptor protein Nck1 in Jurkat T cell activation and function. Clin Exp Immunol. 2012;167:99-107.
3. Ngoenkam J, Paensuwan P, Preechanukul K, Khamsri B, Yiemwattana I, Beck-Garcia E, Minguet S, Schamel WA W, Pongcharoen S. Non-overlapping functions of Nck1 and Nck2 adaptor proteins in T cell activation. Cell Commun Signal 2014;12:21.
4. Paensuwana P, Ngoenkama J, Sanguansermsria D, Khamsria B, Yiemwattana I, Wangteeraprasertc A, Pongcharoen S. RNAi down-regulation of Nck1 adaptor protein in Jurkat T cells. ScienceAsia .2014;40:340-347.
5. Yiemwattana I, Kaomongkolgit R. Alpha-mangostin suppresses IL-6 and IL-8 expression in P.gingivalis LPS-stimulated human gingival fibroblasts. Odontology. 2015;103:348-355.
6. Yiemwattana I, Kaomongkolgit R. Alpha-mangostin suppresses *Porphyromonas gingivalis* LPS-induced IL-1 β and IL-8 expression by reducing MAPK activation in THP-1 cells. West Indian Med J. (in press)

7. Yiemwattana I, Yeesibsan J, Pongcharoen S. Differential induction of MAPK signaling pathways by *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide in human monocytes. *J Inter Dent Med Res.* 2017;10(2):202-206.
8. Kaomongkolgit R, Yiemwattana I. α -Mangostin suppresses 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in human osteosarcoma cells U2OS. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2016;15:2063-2070.
9. Yiemwattana I. The Promising Clinical Applications of Growth Factors in Periodontal Regeneration: A Literature Review. *J Inter Dent Med Res.* 2017;10(3):1021-1028.
10. Yiemwattana I, Chaisomboon N, Jamdee K. Antibacterial and anti-inflammatory potential of *Morus alba* stem extract. *Open Dent J* 2018;12:265-74.

