



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อิทธิพลของเดกชาเมธาโซนในกระบวนซ่อมแซมของเนื้อเยื่อโพรงฟัน
ในห้องปฏิบัติการ

โดย ผศ.ทญ.ดร. ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์ และ คณะ

วันเดือนปีที่เสร็จโครงการ 31 พฤษภาคม 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อิทธิพลของเด็กชาวมะลาโชนในกระบวนการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อโพรงฟันในห้องปฏิบัติการ

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1. ผศ.ทญ.ดร.ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์ | คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2. รศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ ภาวสันต์ | คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 3. ผศ.ทญ.ดร.นันทิชา สารชวนะกิจ | คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ (จากการศึกษาที่ 1)

เมื่อโพรงฟันมีการบาดเจ็บ สันนิษฐานว่า ทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา 1 ถูกหลั่งออกมาจากเนื้อฟันมาสู่เนื้อเยื่อโพรงฟันเพื่อส่งเสริมการหายของแผล เดกซาเมธาโซนเป็นกลูโคคอร์ติคอยด์ที่มีการนำมาใช้รักษาอาการบาดเจ็บของโพรงฟัน และสามารถเหนี่ยวนำดิฟเฟอเรนทีเอชันของเซลล์สร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์ได้ อย่างไรก็ดี ไม่มีการศึกษาถึงผลการทำงานร่วมกันของ ทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา 1 และ เดกซาเมธาโซน การศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่ศึกษาถึงผลของเดกซาเมธาโซนอย่างเดียว และผลของเดกซาเมธาโซนร่วมกับ ทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา 1 พบว่า ทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา 1 สามารถเพิ่มการสร้างไฟโบรเนคติน และ เนิร์ฟโกรธแฟคเตอร์ ขณะที่เดกซาเมธาโซนกระตุ้นไฟโบรเนคติน แต่ยับยั้งการแสดงออกของเนิร์ฟโกรธแฟคเตอร์ พบว่ามีการทำงานแบบเสริมกันของ ทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา 1 และเดกซาเมธาโซน ต่อการแสดงออกของไฟโบรเนคติน อย่างไรก็ดี พบว่า เดกซาเมธาโซนยับยั้งผลการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเนิร์ฟโกรธแฟคเตอร์ โดย ทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา 1 จากการที่เดกซาเมธาโซนกระตุ้นการแสดงออกของไฟโบรเนคตินและกดการหลั่งของเนิร์ฟโกรธแฟคเตอร์ ทำให้สารนี้อาจมีศักยภาพในการนำมาใช้ทางคลินิกเพื่อลดอาการเจ็บปวดและกระตุ้นการหายของแผลในเนื้อเยื่อโพรงฟัน

บทคัดย่อ (จากการศึกษาที่ 2)

เมื่อโพรงฟันมีการบาดเจ็บ ทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา ถูกหลั่งออกมามาก มีการศึกษาแสดงว่าไบโกลแคนมีส่วนร่วมในการสร้างเนื้อฟัน ดังนั้น ไบโกลแคนเป็นตัวบ่งชี้ตัวหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาการหายของแผลในเนื้อเยื่อโพรงฟัน การศึกษานี้ต้องการศึกษาถึงบทบาทของ ทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา ที่มีต่อการแสดงออกของไบโกลแคนโดยเป็นการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงจากโพรงฟันมนุษย์ เซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟันมนุษย์ถูกกระตุ้นด้วย เพื่อเลียนแบบทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา ที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อเลียนแบบสภาวะภายหลังอาการบาดเจ็บ เซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจัดเป็นกลุ่มควบคุม ตรวจสอบการแสดงออกของไบโกลแคนโดยใช้วิธีอาร์ทีพีซีอาร์ พบว่า ทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา สามารถกระตุ้นการแสดงออกของไบโกลแคนได้ภายในเวลา 1 ชั่วโมง และการกระตุ้นเป็นไปในลักษณะที่ขึ้นโดยตรงกับขนาดและเวลา ได้เลือกขนาดที่ดีที่สุดที่กระตุ้นคือ 1 นาโนกรัม ต่อ มิลลิลิตรมาทำการทดลองต่อ เมื่อเติมเอสบี 505124 ซึ่งเป็นสารยับยั้งที่จำเพาะต่อ สแมด ฟอสฟอรีเลชัน ของ ทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา รีเซปเตอร์ พบว่าสามารถยับยั้งการกระตุ้นของ ทรานสฟอร์มิ่ง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา

ได้สันนิษฐานว่าการกระตุ้นเกิดผ่านเส้นทางของสแมต เมื่อเติมสารยับยั้งต่อ พี 38 แมปไคเนส พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างไบโกลแคนได้ สันนิษฐานว่า พี 38 แมปไคเนส มีส่วนร่วมในเส้นทางของการกระตุ้น เมื่อเติมแอนติบอดีที่ยับยั้งการทำงานของ อัลฟาไฟว์เบตาที อินทิกริน พบว่ามีการยับยั้งผลการกระตุ้นของ ทรานสฟอร์มิง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา ได้ แสดงถึงการสื่อสารของ ทรานสฟอร์มิง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา และอินทิกริน ในการแสดงออกของไบโกลแคน สรุปได้ว่า ทรานสฟอร์มิง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา กระตุ้นการแสดงออกของไบโกลแคนในเนื้อเยื่อโครงฟันมนุษย์ โดยผ่านทางเส้นทางของ สแมต 2 และ 3 อินทิกริน และ พี 38 แมปไคเนส ซึ่งให้เห็นถึงศักยภาพพบทบาทของ ทรานสฟอร์มิง โกรธ แฟคเตอร์ เบตา ในการหายของแผลของเนื้อเยื่อโครงฟัน

Abstract (study 1)

During pulp injury, it has been hypothesized that transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is released from dentin into pulp tissue and promotes pulp tissue healing. Dexamethasone is a glucocorticoid that has been used to treat pulp injury, and shown to induce differentiation of hard tissue forming cells. However, interaction between dexamethasone and TGF- β 1 is still unknown. This study aimed to examine the effects of dexamethasone on human pulp cells in the presence of TGF- β 1. TGF- β 1 increased expression and synthesis of both fibronectin and nerve growth factor (NGF), while dexamethasone stimulated fibronectin synthesis, but inhibited NGF expression. Application of both TGF- β 1 and dexamethasone resulted in an additional effect on fibronectin, however, dexamethasone inhibited the TGF- β 1-induced NGF expression. Dexamethasone promotes fibronectin synthesis and suppresses NGF secretion suggesting that this reagent could be used clinically to reduce pain and promote pulp tissue healing.

Abstract (study 2)

In the event of dental pulpal injury, TGF- β was shown to be abundantly present. Biglycan has been shown to involve in the process of dentin formation, therefore, it was chosen to be a marker indicating potential of pulp healing. The present study investigated roles of TGF- β in expression of biglycan in human primary pulp cell culture. Primary cultured human pulp cells were treated with various doses of TGF- β to simulate condition after injury. Non-treated groups were used as negative controls. Expression of biglycan was determined using RT-PCR. It was found that TGF- β induced biglycan mRNA within 1 hour, and the induction was in a dose- and time-dependent manner. The best responded-dose of 1 ng/mL was chosen for subsequent experiments. Application of SB505124, the specific inhibitor on the specific smad phosphorylation site on TGF- β receptor, inhibited the inductive effect of TGF- β , suggesting the smad-dependent pathway. Application of p-38 MAPK inhibitor, but not ERK inhibitor, also inhibited biglycan expression, suggesting the role of p-38 MAPK. Application of neutralizing antibody to α v β 3 integrin also abolished the inductive effect of TGF- β , suggesting the cross-talk between TGF- β and integrin on biglycan expression. In

conclusion, TGF- β up-regulated expression of biglycan in human dental pulp, possibly via the pathways of smad 2, 3, integrin and p-38 MAPK, indicating the potential role of TGF-beta in pulp tissue healing.

สรุปรายละเอียดโครงการ (executive summary)

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	อิทธิพลของเดกซามะธาโซนในกระบวนการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อโพรงฟันใน ห้องปฏิบัติการ
-----------------------	--

(ภาษาอังกฤษ)	Influence of dexamethasone on the healing of pulp tissue in vitro
--------------	---

ชื่อหัวหน้าโครงการ:	นางสาว ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์
	Miss Sirivimol Srisawasdi
	ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ติดต่อ

ที่ทำงาน	ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนน อังรี ดูนังต์ กทม. 10330
----------	--

โทรศัพท์	02 218-8795
----------	-------------

โทรสาร	02 218-8794
--------	-------------

e-mail	dupn1048@truemail.co.th
--------	--

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา :	นาย ประสิทธิ์ ภาวสันต์
	Mr. Prasit Pavasant
	ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์

สถานที่ติดต่อ

ที่ทำงาน	ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรี ดูนังต์ กทม. 10330
----------	--

โทรศัพท์	02 218-8885
----------	-------------

โทรสาร	02 218-8870
--------	-------------

e-mail	prasit.pav@chula.ac.th
--------	--

ระยะเวลาดำเนินงาน :	2 ปี (1 มิถุนายน 2548 – 31 พฤษภาคม 2550)
---------------------	--

วัตถุประสงค์ของโครงการ

คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาผลของเดกซาเมธาโซน ที่มีต่อเซลล์โพรงฟันโดยวัดการแสดงออกของตัวบ่งชี้ (markers) ซึ่งบ่งว่าเซลล์อาจกำลังดิฟเฟอเรนซิเอตเข้าสู่ภาวะการกระตุ้นการหายของแผล (wound healing) โดยมีวัตถุประสงค์ของการศึกษาดังนี้

1. ศึกษาผลของเดกซาเมธาโซน ที่มีต่อเซลล์ในโพรงฟัน โดยดูผลที่มีต่อ fibronectin, osteopontin (OPN) และ biglycan
2. ศึกษาผลของ เดกซาเมธาโซน ที่มีต่อ neurogenic inflammation โดยศึกษาการแสดงออกของ nerve growth factor (NGF)
3. ศึกษาผลของ เดกซาเมธาโซนที่มีต่อการทำงานของ TGF- β ว่ามีลักษณะเป็นการเสริม (synergistic) หรือการต่อต้าน (antagonistic) หรือไม่มีผลใดๆ โดยดูผลที่มีต่อ fibronectin, osteopontin, biglycan และ NGF

ที่มาของปัญหาการวิจัย

เมื่อมีการบาดเจ็บเกิดขึ้นต่อตัวฟันและมีการทำลายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) การตอบสนองต่ออันตรายที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นโดยการสร้างเนื้อฟันตติยภูมิ (tertiary dentin) ภายในบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ โดยเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงฟันจะได้รับการกระตุ้นให้มีการดิฟเฟอเรนซิเอต (differentiate) เป็นเซลล์ที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cell) ซึ่งสามารถสร้างและสะสมเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ขึ้นมาซ่อมแซมส่วนที่บาดเจ็บได้ อย่างไรก็ตาม ความรู้ความเข้าใจในกระบวนการกระตุ้นการดิฟเฟอเรนซิเอตของเซลล์โพรงฟันยังคงไม่มีความชัดเจน ซึ่งความรู้ในกระบวนการเหล่านี้เป็นขั้นตอนสำคัญในการหาวิธีการรักษาทางทันตกรรมที่เหมาะสม เช่น การหาสารที่สามารถให้สัญญาณกระตุ้นจากภายนอกเพื่อกระตุ้นเซลล์โพรงฟันให้ดิฟเฟอเรนซิเอตไปเป็นเซลล์ที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Tziafas et al., 2000, Ranly and Garcia-Godoy, 2000) และเป็นการพัฒนาแนวทางที่จะรักษาภาวะความมีชีวิตของฟันเอาไว้ได้เมื่อฟันนั้นได้รับบาดเจ็บจนมีการสูญเสียเซลล์สร้างเนื้อฟันหรือโอดอนโตบลาสต์ไป

การรักษาสุขภาพมีชีวิตของเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ผ่านมาและเป็นที่ยอมรับคือการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ปิดที่บริเวณเนื้อฟันที่สึกๆภายหลังการกำจัดรอยผุออกไป หรือปิดที่รอยทะลุเข้าสู่โพรงประสาทฟัน (Ranly and Garcia-Godoy, 2000) โดยพบว่าความสำเร็จของการรักษาพอควร คือพบว่าการสร้างเนื้อฟันซ่อมแซม (reparative dentin) ได้ โดยมีความเชื่อว่าภาวะความเป็นด่างสูงช่วยทำให้ลดภาวะการติดเชื้อลงและกระตุ้นให้ร่างกายมีการซ่อมแซมเกิดขึ้นเองโดยเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงฟัน และยังพบว่าความเป็นด่างของแคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถ

กระตุ้นให้มีการปลดปล่อย growth factor บางตัว เช่น TGF- β ซึ่งหลั่งออกจากเนื้อฟันมากขึ้นจะเป็นตัวไปช่วยกระตุ้นให้เซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงฟันสามารถดิฟเฟอเรนซิเอทเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟันและสามารถสร้างเนื้อฟันซ่อมแซมได้ อย่างไรก็ตามพบว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์มีการละลายตัวที่สูงและไม่แข็งแรง ทำให้การบูรณะฟันภายหลังมีฐานรองรับ (foundation) วัสดุบูรณะที่ไม่แข็งแรง ได้มีความพยายามใช้สารบอนด์ (dentin bonding agent) ร่วมกับการใช้กรดกัดเนื้อฟัน (dentin acid etching) มาทำการรักษาภาวะการทะลุเข้าโพรงประสาทฟัน แต่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากวิธีการใช้ค่อนข้างยุ่งยาก (Ranly and Garcia-Godoy, 2000) ปัจจุบันจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับความพยายามที่จะใช้สารอื่นในการกระตุ้นให้เซลล์ในโพรงฟันดิฟเฟอเรนซิเอทเป็นเซลล์ที่คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน เช่นการใช้สารสเตียรอยด์ (steroid) กลุ่มเดกซาเมธาโซน (dexamethasone) โดยมีการศึกษาทั้งในเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์ในโพรงประสาทฟัน การศึกษาในเซลล์สร้างกระดูกพบว่าเดกซาเมธาโซนสามารถกระตุ้นให้ bone marrow stromal cell มีการดิฟเฟอเรนซิเอทเป็นเซลล์ที่คล้ายเซลล์สร้างกระดูกได้โดยผ่านทาง Glucocorticoid Responsive Elements หรือ GRE components เนื่องจากเดกซาเมธาโซนเป็นกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid) ซึ่งมีสมบัติเป็นฮอร์โมนจึงสามารถผ่านเข้าเซลล์ได้โดยจับกับ glucocorticoid receptor และผ่านเข้านิวเคลียสของเซลล์แล้วจึงจับกับ GRE ซึ่งพบอยู่บนยีน (gene) ของ bone marker หลายตัว ได้แก่ โบนไฮโอโลโปรตีน (bone sialoprotein หรือ BSP) และ ออสติโอแคลซิน (osteocalcin) เป็นต้น (Cheng et al., 1994, Owen et al., 1993, Heinrichs et al., 1993, Ogata et al., 1995) สำหรับการศึกษาในเซลล์โพรงฟันนั้นพบว่าในผู้ป่วยและในหนูที่ได้รับสารคอร์ติโคสเตียรอยด์ทางระบบเป็นเวลานานพบว่าทำให้โพรงฟันแคบลงเพราะมีการสร้างเนื้อฟันเพิ่มขึ้น (Nasstrom, 1996, Symons et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้เดกซาเมธาโซนอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับสารอื่น เช่น วิตามินดี หรือ basic fibroblast growth factor (bFGF) จะสามารถกระตุ้นให้มีการดิฟเฟอเรนซิเอทของเซลล์จนเกิดการสร้างสารอินทรีย์ได้ทั้งในเซลล์กระดูก (Ishida and Heersche, 1998, Pri-Chen et al., 1998) และในเซลล์โพรงฟัน (Kasugai et al., 1993, Ferrari and Byers, 1996) อย่างไรก็ตาม ยังไม่ได้มีการอธิบายถึงกลไกที่ชัดเจนในเซลล์โพรงฟันแต่เชื่อกันว่าจะมีทิศทางที่คล้ายคลึงกับเซลล์กระดูก ดังนั้น ทิศทางของงานวิจัยเกี่ยวกับชีววิทยาของโพรงฟันในปัจจุบันจึงเน้นการศึกษาเพื่อหาสารที่มีความสามารถในการกระตุ้นการดิฟเฟอเรนซิเอทของเซลล์โพรงฟัน อันจะนำไปสู่การซ่อมแซมของเนื้อเยื่อโพรงฟันหลังจากการเกิดอันตรายต่อฟัน และทางกลุ่มผู้วิจัยเห็นว่าเดกซาเมธาโซนน่าจะเป็นสารที่มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้กระตุ้นเซลล์โพรงฟัน วัตถุประสงค์ของผู้วิจัยในการศึกษานี้ต้องการศึกษาถึงผลและความเป็นไปได้ในการใช้สารสเตียรอยด์พวกเดกซาเมธาโซนกระตุ้นเซลล์โพรงฟัน โดยศึกษาทั้งในแง่บทบาทของเดกซาเมธาโซนที่มีต่อเซลล์โพรงฟัน และผลรวมของเดกซาเมธาโซน

กับ growth factor TGF- β ที่หลั่งออกมาจากเนื้อฟันเป็นจำนวนมากเมื่อเกิดการบาดเจ็บ โดยทำการวัดตัวบ่งชี้ (markers) ของการเกิดดีฟเฟอเรนซีเอชั่นของเซลล์โพรงฟันหลายๆตัวที่บ่งว่าเซลล์อาจกำลังเข้าสู่ภาวะการก่อสร้างเนื้อเยื่ออินทรีย์

เอกสารอ้างอิง

- Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avoli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994; 134: 277-86.
- Ferrari AM, Byers MR. Chronic dexamethasone treatment and its effects on sensory neuropeptides, pulpal injury reactions and reparative dentin. *Brain Res* 1996;723:125-34.
- Heinrichs AA, Bortell R, Rahman S, Stein JL, Alnemri ES, Litwack G, Lian JB, Stein GS. Identification of multiple glucocorticoid receptor binding sites in the rat osteocalcin gene promoter. *Biochemistry* 1993; 32(42): 11436-44.
- Ishida Y, Heersche JNM. Glucocorticoid-induced osteoporosis: Both in vivo and in vitro concentrations of glucocorticoids higher than physiological levels attenuate osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 1998;13:1822-6.
- Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H. Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Arch Oral Biol* 1993;38:769-77.
- Ogata Y, Yamauchi M, Kim RH, Li JJ, Freedman LP, Sodek J. Glucocorticoid regulation of bone sialoprotein (BSP) gene expression. Identification of a glucocorticoid responsive element in the bone sialoprotein gene promoter. *Eur J Biochem* 1995; 230(1): 183-92.
- Owen TA, Bortell R, Shalhoub V, Heinrichs A, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Postproliferative transcription of the rat osteocalcin gene is reflected by vitamin D-responsive developmental modifications in protein-DNA interactions at basal and enhancer promoter elements. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 1503-07.
- Nasstrom K. Dentin formation after corticosteroid treatment. A clinical study and an experimental study on rats. *Swed Dent J Suppl.* 1996; 115: 1-45.

Pri-Chen S, Pitaru S, Lokiec F, Savion N. Basic fibroblast growth factor enhances the growth and expression of the osteogenic phenotype of dexamethasone-treated human bone marrow-derived bone-like cells in culture. Bone 1998; 23: 111-17.

Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. J Dent 2000; 28: 153-61.

Symons AL, Henry AC, Chang S, Daley TJ, Harbrow DJ, Joseph BK. The effect of glucocorticosteroid treatment on dentine formation in the Lewis rat, a histological study. Growth Factors 2000; 18: 157-67.

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. J Dent 2000; 28: 77-92.

Wildemann B, Schmidmaier G, Brenner N, Huning M, Stange R, Haas NP, Raschke M. Quantification, localization and expression of IGF-I and TGF- β 1 during growth factor-stimulated fracture healing. Calcif Tissue Int 2004; 74: 388-97.

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาแบ่งออกเป็น 3 ตอนตลอดระยะเวลา 2 ปี ดังนี้

การศึกษาที่ 1 เป็นการศึกษาผลของเดกซาเมธาโซนที่มีต่อการแสดงออกของ fibronectin และ NGF ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย TGF- β 1 ในเซลล์โพรงฟันมนุษย์

ผลการทดลอง

1. TGF- β 1 เหนี่ยวนำการสร้าง NGF ในเซลล์โพรงฟันมนุษย์ในลักษณะ dose-dependent
2. เดกซาเมธาโซนลดการหลั่ง NGF
3. เดกซาเมธาโซนยับยั้งอำนาจการเหนี่ยวนำของ TGF- β 1

(รายละเอียดงานวิจัยในตอนนี้ นำเสนอในรูปแบบบทความที่ได้รับการตีพิมพ์)

การศึกษาตอนที่ 2 เป็นการศึกษาบทบาทของ TGF- β 1 ที่มีต่อการแสดงออกของ biglycan ในเซลล์โพรงฟันมนุษย์

ผลการทดลอง

1. TGF- β เห็นย่นำการแสดงออกของ biglycan ในลักษณะ dose- และ time-dependent
2. TGF- β กระตุ้นการแสดงออกของ biglycan mRNA ภายใน 1 ชั่วโมง
3. เมื่อเติม SB505124 ซึ่งเป็น inhibitor ที่จำเพาะต่อ smad phosphorylation site ของ TGF- β receptor สามารถยับยั้งผลการเห็นย่นำของ TGF- β ได้ ทำให้สันนิษฐานได้ว่า กระบวนการเห็นย่นำน่าจะผ่านทาง smad dependent pathway.
4. เมื่อเติม p-38 inhibitor สามารถยับยั้งการแสดงออกของ biglycan ทำให้สันนิษฐานได้ว่า กระบวนการเห็นย่นำน่าจะมีส่วนร่วมของ p-38 MAPK.
5. เมื่อเติม neutralizing antibody ต่อ $\alpha v \beta 3$ integrin พบว่าสามารถลดอำนาจการกระตุ้นของ TGF- β ได้ สันนิษฐานว่าน่าจะมีการสื่อสารกันระหว่าง TGF- β และ integrin ในกระบวนการกระตุ้นการสร้าง biglycan

ผู้วิจัยสรุปในเบื้องต้นว่า TGF- β สามารถกระตุ้นการสร้าง biglycan ในเนื้อเยื่อโครงร่างมนุษย์ได้ โดย signaling pathway ของการเห็นย่นำให้มีการสร้าง biglycan น่าจะเกี่ยวข้องกับ MAPK และ smad pathway และน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับ signaling pathway ที่เกี่ยวข้องกับ integrin ด้วย อย่างไรก็ตาม ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อสรุปที่แน่นอนกว่านี้ เช่นการยืนยันด้วย real-time PCR และการตรวจหาระดับโปรตีน เป็นต้น

การศึกษาในตอนที่ 2 นี้ เป็นการศึกษาที่คณะผู้วิจัยทำเพิ่มเติมจากวัตถุประสงค์เดิมของโครงการ เนื่องจากเป็นสิ่งที่คณะผู้วิจัยให้ความสนใจอยู่

การศึกษาตอนที่ 3 เป็นการศึกษาบทบาทของ TGF- β และเดกซาเมทาโซนที่มีต่อการแสดงออกของ OPN ในเซลล์โครงร่างมนุษย์ ผลการวิจัยในเบื้องต้น พบว่า

1. TGF- β สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ OPN mRNA แต่ไม่มีผลต่อระดับการสร้างโปรตีน แสดงว่ามีการควบคุมโดยเส้นทางอื่นในระดับ translation
2. เดกซาเมทาโซนสามารถเพิ่มการแสดงออกของ OPN ได้ทั้งในระดับการสร้าง mRNA และระดับการสร้างโปรตีน
3. ไม่พบผลการกระตุ้นแบบเสริมกัน (additional effect) ของ TGF- β และเดกซาเมทาโซนในการสร้าง OPN

4. พบว่า TGF- β และเดกซาเมธาโซนมีกระตุ้นแบบเสริมกันในการแสดงออกของ biglycan แต่ไม่สามารถ repeat ผลการทดลองได้เนื่องจากพบปัญหาที่เกิดจาก antibody ที่ใช้ตรวจสอบระดับโปรตีนของ biglycan

คำชี้แจงเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทิศทางของการวิจัย

1. คณะผู้วิจัยตัดสินใจชะลอการทดลองในส่วนของการศึกษาผลของเดกซาเมธาโซนที่มีต่อการแสดงออกของ biglycan เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องเวลาและงบประมาณ อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยมีความตั้งใจที่จะทำการศึกษาต่อในเรื่องนี้หลังจากที่เราสามารถศึกษาให้กระจ่างชัดและยืนยันได้ถึงผลของ TGF- β ที่มีต่อการแสดงออกของ biglycan
2. คณะผู้วิจัยตัดสินใจชะลอการศึกษาเกี่ยวกับ decorin เนื่องจากต้องการศึกษาเกี่ยวกับ signaling pathway ของ biglycan ให้ชัดเจน ด้วยเห็นว่าเป็นเรื่องที่น่าสนใจมาก ถึงแม้ว่าผลการทดลองที่นำเสนอเป็นเพียงผลเบื้องต้น แต่คณะผู้วิจัยจะศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ผลที่ยืนยันกระจ่างชัดในอนาคต

.....
(ผศ.ทญ.ดร.ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์)

หัวหน้าโครงการวิจัย

เนื้อหาการวิจัย

การศึกษาที่ 1 เป็นการศึกษาผลของเดกซาเมธาโซนที่มีต่อการแสดงออกของ fibronectin และ NGF ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย TGF- β 1 ในเซลล์โพรงฟันมนุษย์ (รายละเอียดตาม reprint ที่แนบมา)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาถึงผลของเดกซาเมธาโซนที่มีต่อการแสดงออกของ fibronectin และ NGF ในเซลล์โพรงฟันมนุษย์ ในภาวะที่มี และ ไม่มี TGF- β 1 เพื่อดูความเป็นไปได้ของการนำเดกซาเมธาโซนมาช่วยกระตุ้นการหายของแผลในการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อโพรงฟัน

การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟันของผู้ป่วยที่มาถอนฟันที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ ที่ไม่มีการติดเชื้อหรือรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อที่ได้จากคนไข้อย่างน้อย 3 คน ($n \geq 3$) และเตรียมเซลล์โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้คือ นำฟันที่ได้มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซอลายน์ (Phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อหลายๆครั้ง จากนั้นใช้คีมถอนฟันปราศจากเชื้อบีบฟันให้แตกและนำเอาเฉพาะส่วนเนื้อเยื่อโพรงฟันออกมาเก็บทันทีในน้ำยาสารอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อที่ได้ถูกตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปวางในจานเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish; Nunc) ขนาด 35 มิลลิเมตร อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ 10, กลูตามีน (glutamine), ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotics) เซลล์ถูกเลี้ยงในตู้บัพที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศร้อยละ 5 อาหารเลี้ยงเซลล์ถูกเปลี่ยนทุกวันจนเซลล์เคลื่อนออกจากชั้นเนื้อมาอยู่บนจานเลี้ยง

เมื่อเซลล์บนจานเลี้ยงเจริญจนเต็มพื้นที่ของจานเลี้ยงเซลล์แล้ว เซลล์ถูกถ่ายออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ขนาด 60 มิลลิเมตร และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 หลังจากนั้นเซลล์ถูกหว่านใหม่ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) เซลล์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเซลล์ในรุ่นที่ 3-5 และทุกการทดสอบใช้จำนวนตัวอย่างอย่างน้อย 3 ชุด

การกระตุ้นเซลล์ด้วยเดกซาเมธาโซนและ TGF- β 1

เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ ที่ความหนาแน่น 25,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงทำการกระตุ้นเซลล์ด้วยเดกซาเมธาโซนที่ความเข้มข้น 200 nM TGF- β 1 ที่ความเข้มข้น 1 ng/mL หรือกระตุ้นด้วยสารทั้ง 2 ชนิดรวมกัน

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออก mRNA ของ Fibronectin (Fn) และ NGF ด้วยวิธี RT-PCR

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ Fn และ NGF mRNA ด้วยวิธี RT-PCR กระทำภายหลังเซลล์ถูกกระตุ้นแล้ว 24 ชั่วโมง โดย RNA ถูกสกัดจากเซลล์ด้วยสารละลาย TRIzol (Gibco, USA) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัท RNA จำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลองถูกนำไปผ่านกระบวนการรีเวอร์ส ทรานสคริปเตส (reverse transcriptase, RT) เพื่อสร้างคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ (complementary DNA) คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาขยายสัญญาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์แทคโพลิเมอเรส (Taq polymerase) และไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อ mRNA ของ Fn และ NGF โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์จากลำดับของสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีรายงานแล้ว และใช้ไพรเมอร์ต่อเอนไซม์ GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง (internal control) สำหรับการตรวจสอบว่าปริมาณของอาร์เอ็นเอตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน สัญญาณที่ได้จาก PCR ถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยไฟฟ้าในอกาโรสเจล (agarose gel) และอ่านค่าด้วยเครื่อง Gel Documentation System ของบริษัท Bio-Rad

การดูผลของการกระตุ้นที่มีต่อ fibronectin โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการวิเคราะห์

แบบ Western Blot Analysis

เซลล์และเมทริกซ์ถูกสกัดและนำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนโดยชุดวัดโปรตีน BCA สารละลายที่มีปริมาณโปรตีนที่เท่ากันจากแต่ละกลุ่มการทดลองถูกแยกด้วยไฟฟ้าในอะคริลามายด์เจล จากนั้นโปรตีนถูกถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยกระแสไฟฟ้า แล้วทำการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ fibronectin ทำการตรวจสอบสัญญาณโดยใช้วิธี auto-fluorography โดยการเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย chemiluminescence detection system และตรวจสอบสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซเรย์

การดูผลของการกระตุ้นที่มีต่อปริมาณ NGF โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

ทำการวัดปริมาณของ NGF จาก culture medium โดยใช้ชุดวัด ELISA kit (Quantikine; R&D System, Minneapolis, MN) โดยทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยทำการวัดจากตัวอย่างอย่างน้อย 3 ชุด

การศึกษาที่ 2 เป็นการศึกษาบทบาทของ TGF- β 1 ที่มีต่อการแสดงออกของ biglycan ในเซลล์โพรงฟันมนุษย์ โดยมีการเลี้ยงเซลล์เหมือนการศึกษาที่ 1 และกระตุ้นเซลล์ภายหลังการเลี้ยง 24 ชั่วโมงด้วย TGF- β 1 ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 5.0 ng/mL โดยมีกลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และเลือกขนาดที่ตอบสนองดีที่สุดมาใช้ในการศึกษาต่อไป

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ Biglycan ด้วยวิธี RT-PCR

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ Biglycan ด้วยวิธี RT-PCR กระทำภายหลังเซลล์ถูกกระตุ้นแล้วที่เวลา 1 4 8 และ 24 ชั่วโมง โดย RNA ถูกสกัดจากเซลล์ด้วยสารละลาย TRIzol (Gibco, USA) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัท RNA จำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลอง ถูกนำไปผ่านกระบวนการรีเวอร์ส ทรานสคริปเตส (reverse transcriptase, RT) เพื่อสร้างคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ (complementary DNA) หรือ cDNA ด้วยเอนไซม์เอเอ็มวี (AMV; avian myeloblastosis virus) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอที่ได้ ถูกนำมาขยายสัญญาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Taq polymerase) และไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อ mRNA ของ biglycan โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์จากลำดับของสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีรายงานแล้ว และใช้ไพรเมอร์ต่อเอนไซม์ GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง (internal control) สำหรับการตรวจสอบว่าปริมาณของอาร์เอ็นเอตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน สัญญาณที่ได้จาก PCR จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยไฟฟ้าในอากาโรสเจล (agarose gel) และอ่านค่าด้วยเครื่อง Gel Documentation System ของบริษัท Bio-Rad

Pathway ของ signaling ของการกระตุ้นการแสดงออกของ biglycan ถูกทดลอง โดยการเติมสารดังต่อไปนี้

1. SB203580 (Calbiochem) ซึ่งเป็น P38 MAPK inhibitor ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 – 3000 nM
2. SB505124 (Sigma) ซึ่งเป็น TGF- β R I inhibitor ความเข้มข้น 25 nM
3. SB43152 (Tocris Cookson Inc.) ซึ่งเป็น TGF- β R I inhibitor ความเข้มข้น 100 nM

โดยการเติม inhibitor เหล่านี้ 30 นาทีก่อนการกระตุ้นด้วย TGF- β และเลี้ยงเซลล์ต่อไปนาน 16 ชั่วโมง แล้วจึงสกัด mRNA เพื่อการแสดงออกของ biglycan โดย RT-PCR ส่วนการดูผลที่มีต่อ phosphorylation ได้เลี้ยงเซลล์ต่อไปเพียง 15 นาที จึงสกัด mRNA เพื่อดูผลที่มีต่อ phosphorylation

Fibronectin	forward	5' GGA TCA CTT ACG GAG AAA CAG 3'
	reverse	5' GGA TTG CAT GCA TTG TGT CCT 3'
NGF	forward	5' ATA CAG GCG GAA CCA CAC TCA G 3'
	reverse	5' GTC CAC AGT AAT GTT GCG GGT C 3'
GAPDH	forward	5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT 3'
	Reverse	5' TCA CAC CCA TGA CGA ACA TGG 3'
Biglycan	forward	5' TATCTGAGAGGCTGGGCTTA 3'
	Reverse	5' GGATTCCTACTTGCCTTGGA 3'

ผลการทดลองจากการศึกษาที่ 1

รูปที่ 1 (Figure 1) แสดงผลของเดกซาเมธาโซนที่สามารถกระตุ้นการสร้าง fibronectin แต่ลดการสร้าง NGF ในเซลล์โพรงฟัน เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเดกซาเมธาโซนความเข้มข้น 200 nM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลจาก RT-PCR (figure 1A) แสดงผลการกระตุ้นที่มีต่อการแสดงออกของ fibronectin และ NGF กราฟทางด้านขวามือ แสดงความแตกต่างของการแสดงออก (mean $\pm$ S.D, control = 1) จาก 3 ตัวอย่าง Fig. 1B แสดงผลที่มีต่อ fibronectin โดย Western Blot analysis กราฟด้านล่างแสดงการเปรียบเทียบความเข้มของ band (mean $\pm$ S.D.) จาก 3 ตัวอย่าง Fig. 1C แสดงผลของการสร้างโปรตีน NGF ตรวจโดยใช้ ELISA (mean $\pm$ S.D.)

รูปที่ 2 (Figure 2) แสดงผลของ TGF- β 1 ที่มีต่อการสร้าง fibronectin และ NGF ในเซลล์โพรงฟันมนุษย์ เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 1 ng/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง Fig. 2A แสดงผลของการกระตุ้นที่มีต่อ fibronectin และ NGF โดยใช้ RT-PCR analyses กราฟทางด้านขวามือเปรียบเทียบความเข้มของ band

(mean $\pm$ S.D.) จาก 3 ตัวอย่าง (control = 1). Fig. 2B แสดงผลการกระตุ้นที่มีต่อการสร้างโปรตีน fibronectin โดยใช้ Western Blot analysis กราฟด้านล่าง แสดงความเข้มของ band (mean $\pm$ S.D.) จาก 3 ตัวอย่าง Fig. 1C แสดงผลต่อการสร้าง NGF ตรวจโดยใช้ ELISA (mean $\pm$ S.D.)

รูปที่ 3 (Figure 3) แสดงผลรวมของ TGF- β 1 และ เดกซาเมธาโซน เซลล์ถูกกระตุ้นเป็นเวลา 24

ชั่วโมงด้วยเดกซาเมธาโซนความเข้มข้น 200 nM อย่างเดียว หรือ TGF- β 1 ความเข้มข้น 1 ng/mL อย่างเดียว หรือกระตุ้นด้วยสารทั้งสองพร้อมกัน ระดับโปรตีนของ fibronectin แสดงใน Fig. 3A โดย Western Blot analyses แสดงให้เห็นถึงการทำงานเสริมกันของเดกซาเมธาโซนและ TGF- β 1 กราฟด้านขวาแสดงการเปรียบเทียบความเข้มของ band ผลของการกระตุ้นที่มีต่อการสร้าง NGF แสดงใน Fig. 3B โดยการใช้ ELISA พบว่าเดกซาเมธาโซนสามารถกดผลการกระตุ้นของ TGF- β 1 ได้

Figure 1

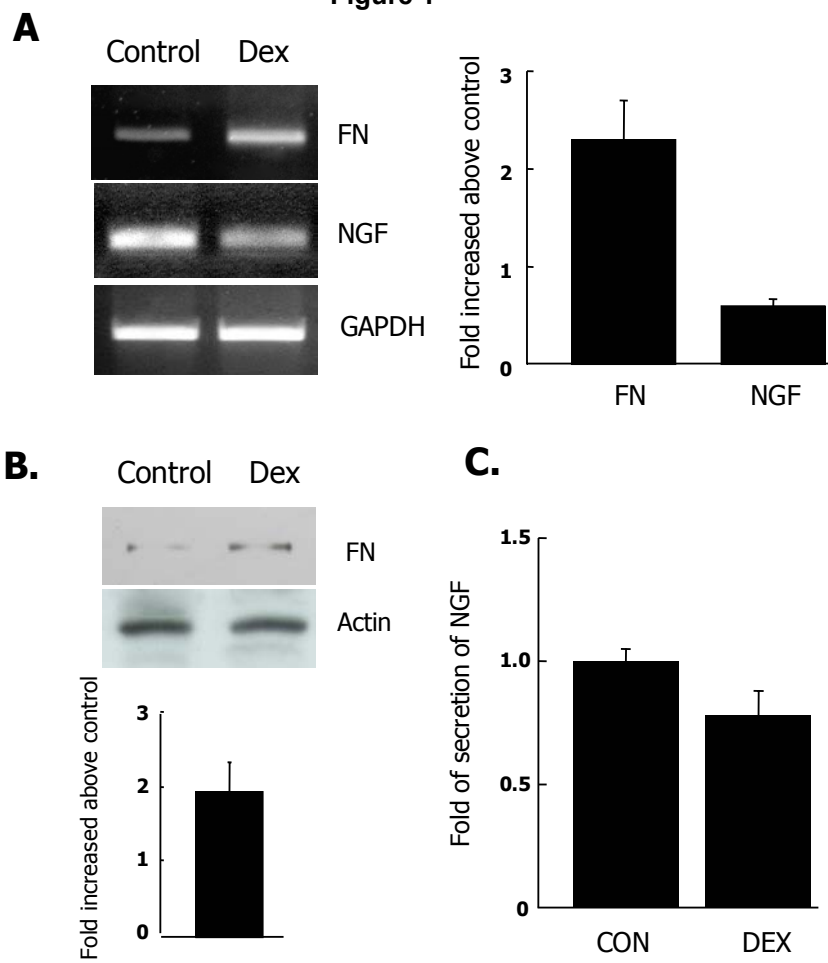
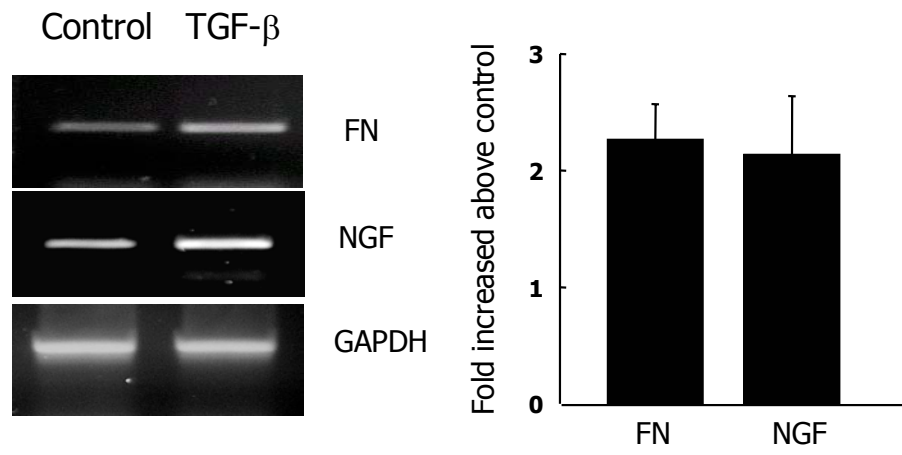
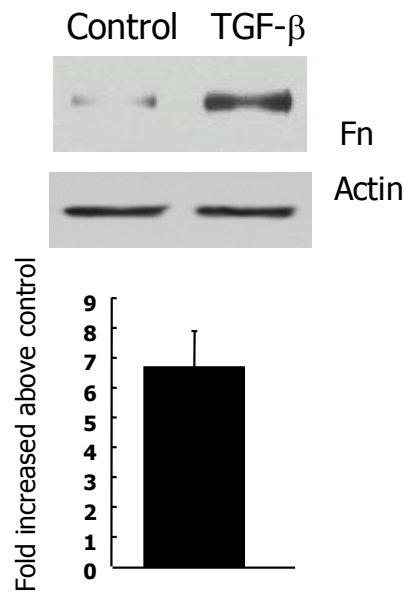


Figure 2

A



B



C

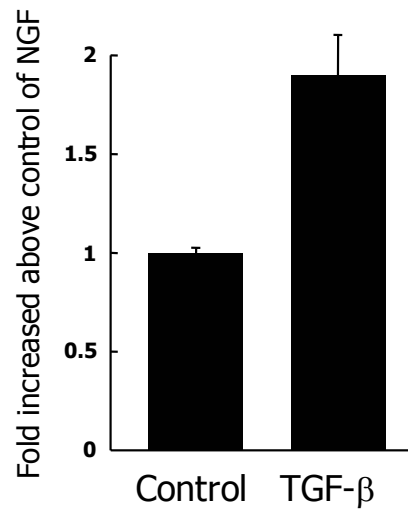
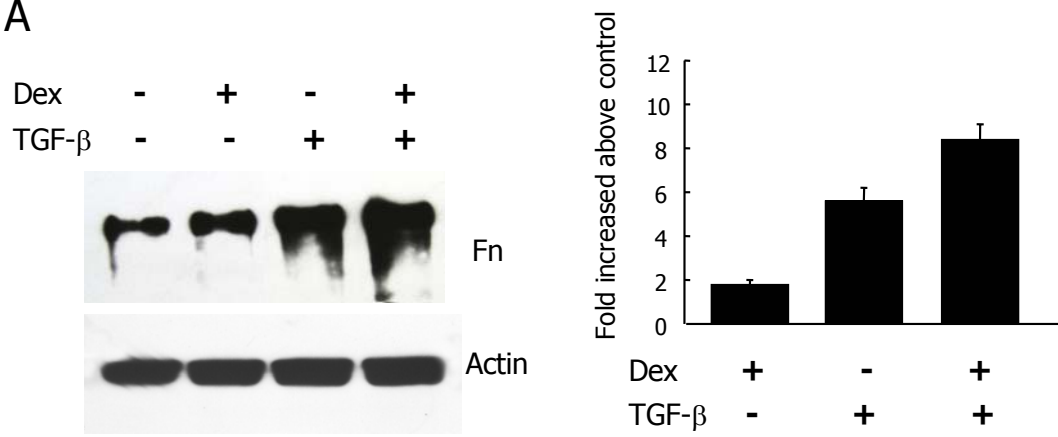
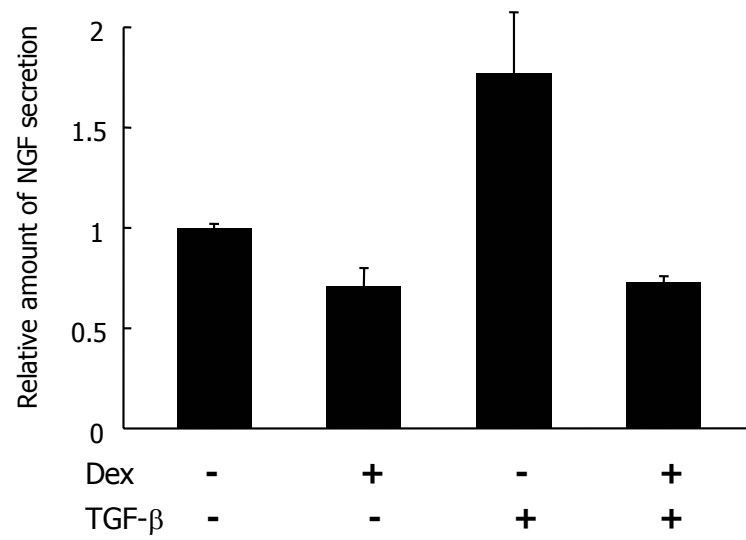


Figure 3

A



B



ผลการทดลองจากการศึกษาที่ 2

รูปที่ 1 (Figure 1) แสดงผลการกระตุ้นเซลล์โพรงฟันด้วย TGF- β ที่มีต่อการสร้าง biglycan mRNA ตรวจโดยการ RT-PCR โดยใช้ความเข้มข้นของ TGF- β ขนาด 0.5 1.0 และ 5.0 ng/mL เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ($n = 3$) พบว่ามีการตอบสนองในลักษณะ dose-dependent กราฟด้านล่างเป็นการเปรียบเทียบความเข้มของ band (mean $\pm$ S.D.) พบว่าขนาดที่กระตุ้นการสร้าง biglycan ได้ดีที่สุดคือ 1 ng/mL ซึ่งเป็นขนาดที่เลือกมาใช้ทำการศึกษาค้นคว้าต่อไป

รูปที่ 2 (Figure 2) แสดงผลของ RT-PCR เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- β ความเข้มข้น 1 ng/mL และดูการตอบสนองโดยการวัดการแสดงออกของ biglycan mRNA ที่เวลา 1 4 8 และ 24 ชั่วโมง พบว่า TGF- β สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ biglycan ในลักษณะของ time-dependent และ TGF- β สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ biglycan ได้ภายใน 1 ชั่วโมง

รูปที่ 3 (Figure 3) แสดงผลการแสดงออกของ biglycan เมื่อเติม SB43152 และ SB505124 ซึ่งเป็น TGF- β R I inhibitor ที่ความเข้มข้น 100 และ 25 nM ตามลำดับ โดยเติม 30 นาทีก่อนการกระตุ้นด้วย 1 ng/mL TGF- β และดูการตอบสนองภายหลังการเลี้ยงเซลล์ข้ามคืนหรือประมาณ 16 ชั่วโมง โดยการวัดการแสดงออกของ biglycan mRNA โดยใช้ RT-PCR พบว่า inhibitors ทั้ง 2 ตัว สามารถยับยั้งการกระตุ้นของ TGF- β ได้เป็นบางส่วน แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีกลไกอื่นอีกที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง biglycan ที่กระตุ้นโดย TGF- β

รูปที่ 4 (Figure 4) เมื่อเติม SB203580 ซึ่งเป็น P38 MAPK inhibitor ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 30 – 3000 nM พบว่าสามารถยับยั้งการกระตุ้นของ TGF- β ได้ในลักษณะเป็น dose-dependent ทำให้สันนิษฐานว่า การกระตุ้นการแสดงออกของ biglycan โดย TGF- β อาจจะผ่านทาง pathway ของ P38 MAPK

รูปที่ 5 (Figure 5) เมื่อเติม SB43152 ซึ่งเป็น TGF- β R I inhibitor และ SB203580 ซึ่งเป็น P38 MAPK inhibitor ก่อนการกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- β พบว่า inhibitors ทั้ง 2 ตัวทำงานเสริมกันและสามารถยับยั้งการกระตุ้นการแสดงออกของ biglycan ได้เกือบ 100% เมื่อเทียบกับการใช้ inhibitor ที่ละตัวและเมื่อเปรียบเทียบกับ

กับกลุ่มควบคุมผลการกระตุ้นเซลล์โพรงฟัน ซึ่งผลการทดลองนี้ได้ทำการยืนยันผลโดยการทำ real-time PCR ดังแสดงผลในรูปที่ 6

รูปที่ 6 (Figure 6) ผลจากการทดลองดังแสดงในรูปที่ 5 โดยวัดผลการกระตุ้น โดยการใช้ real-time PCR พบว่าได้ผลตรงกันกับผลที่ได้ข้างต้น อย่างไรก็ตาม นักวิจัยยังไม่มีโอกาสทำการใช้ real-time PCR ซ้ำ ผลที่ได้เป็นผลจากการทดลองเพียง 1 ครั้ง

รูปที่ 7 (Figure 7) แสดงผลการกระตุ้นของ TGF- β ที่มีต่อการแสดงออกของ biglycan เมื่อเติม neutralizing antibody ต่อ $\alpha 5\beta 3$ integrin พบว่าสามารถยับยั้งการกระตุ้นได้ แสดงถึงกลไกการกระตุ้นน่าจะเกี่ยวข้องกับ integrin

รูปที่ 8 (Figure 8) จากการศึกษาโดยการเติม SB43152 ซึ่งเป็น TGF- β R I inhibitor และ P38 MAPK inhibitor ก่อนการกระตุ้นด้วย TGF- β และทิ้งไว้ 15 นาทีก่อนนำมาวัดการแสดงออกของ p-smad เพื่อดูระดับ phosphorylation ที่เกิดขึ้น พบว่า เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β ทำให้มี phosphorylation ของ smad3 มากขึ้น ในขณะที่ P38 MAPK inhibitor สามารถยับยั้งการเกิด smad3 phosphorylation ด้วย จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า inhibitor ทั้ง 2 ตัวยับยั้งการแสดงออกของ biglycan

สรุปในเบื้องต้นว่า TGF- β สามารถกระตุ้นการสร้าง biglycan ในเซลล์โพรงฟันได้ signaling pathway ของการเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง biglycan น่าจะเกี่ยวข้องกับ MAPK และ smad pathway และน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับ signaling pathway ที่เกี่ยวข้องกับ integrin ด้วย อย่างไรก็ตาม ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่แน่นอนกว่านี้ เช่นการยืนยันด้วย real-time PCR และการตรวจหาระดับโปรตีน เป็นต้น

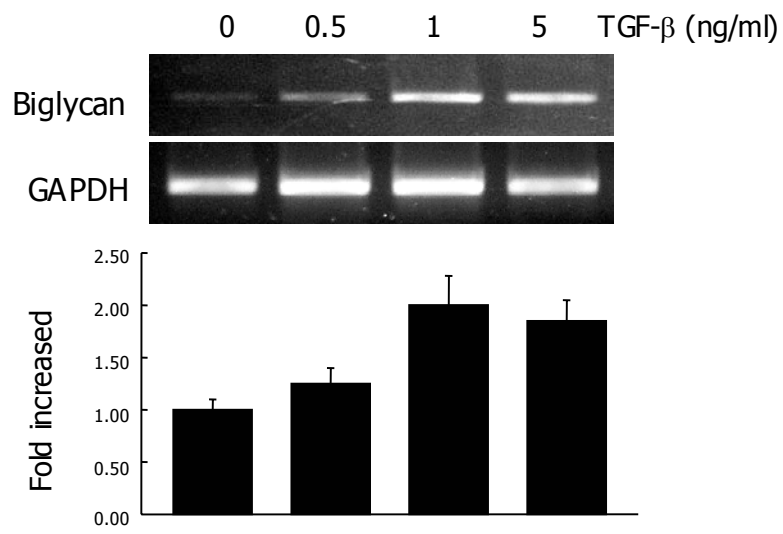


Figure 1

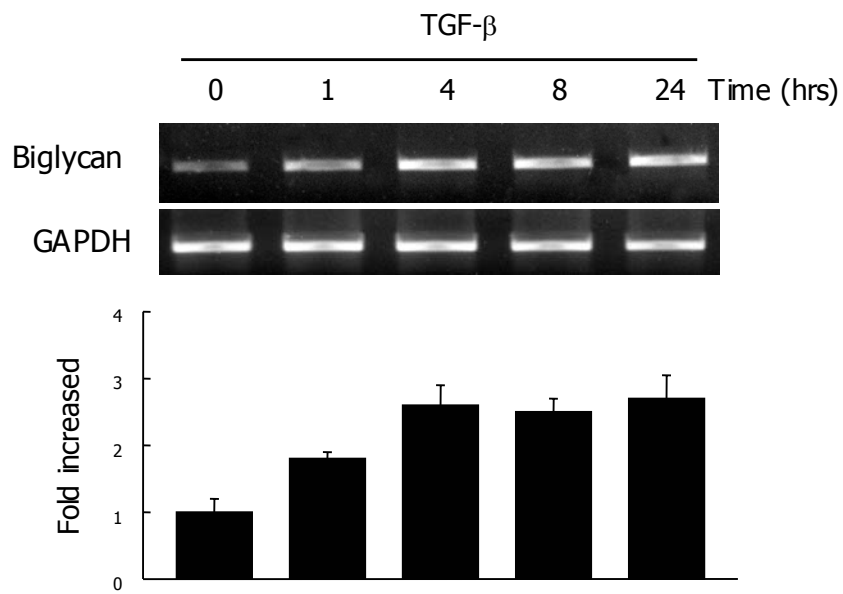


Figure 2

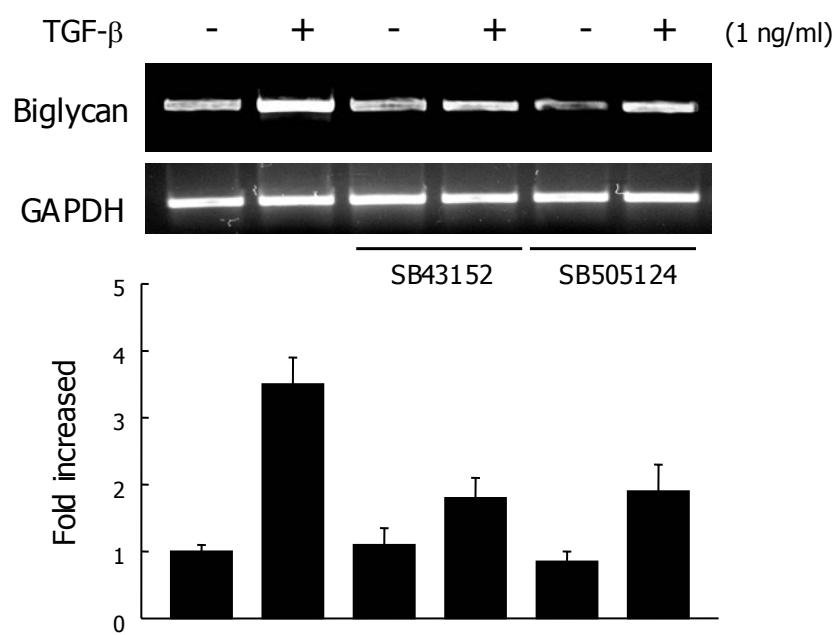


Figure 3

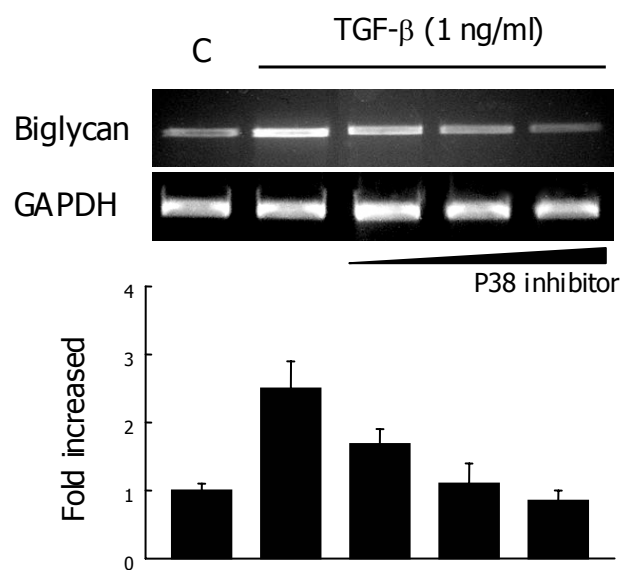
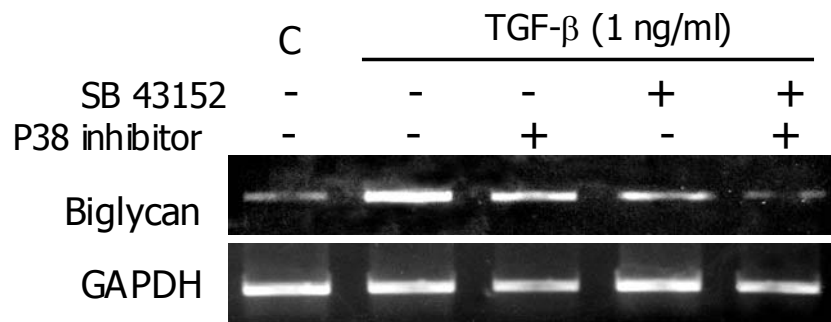


Figure 4



The experiment was confirmed using real time PCR as shown in next slide.

Figure 5

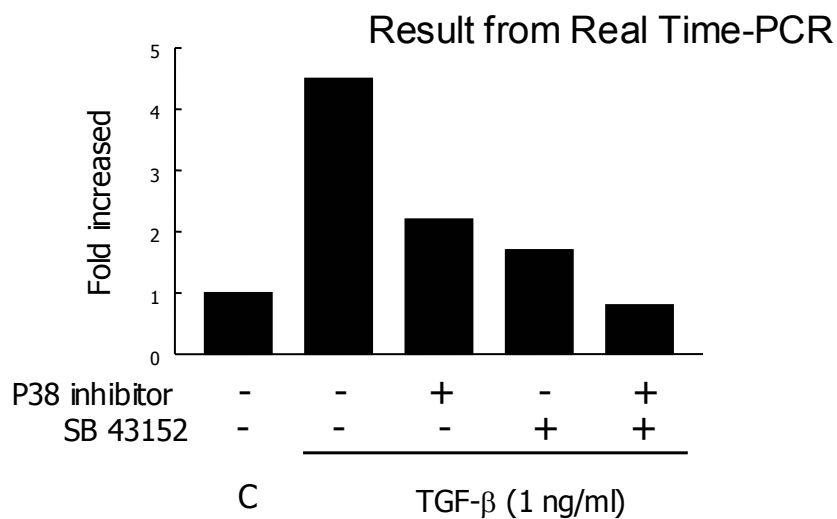


Figure 6

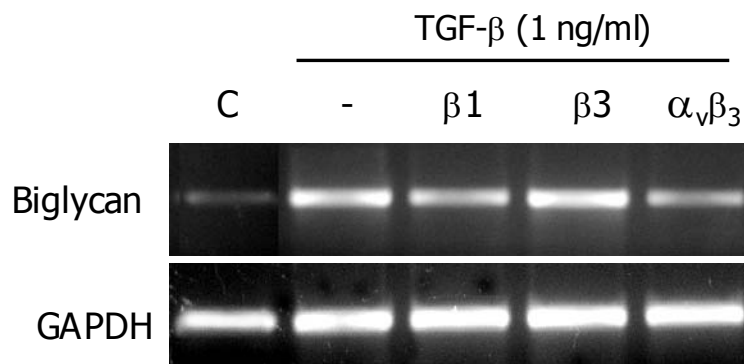


Figure 7 Preliminary results suggested the involvement of integrin signaling pathway in the regulation of biglycan. These results need further investigation.

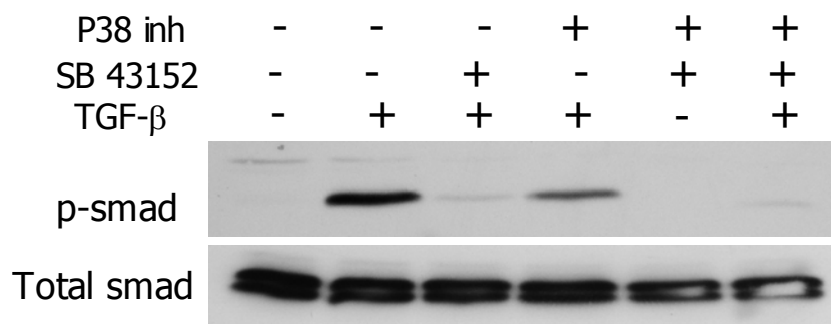


Figure 8 Results indicated that TGF-treated cells increased phosphorylation of smad3. P38 MAPK inhibitor also inhibited smad3 phosphorylation. Addition of both inhibitors totally inhibited biglycan expression.. Significance of these results need further investigation.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. Srisawasdi S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. Dexamethasone Reduced Expression of NGF in Cultured Human Pulp Fibroblasts. Journal of Dental Research 2006; special issue 84. และนำเสนอในการประชุม 84th General session of the International Dental Research, Brisbane, Australia, 2006
2. บทความตีพิมพ์ Srisawasdi S, Pavasant P. Different Roles of Dexamethasone on Transforming Growth Factor β 1-induced Fibronectin and Nerve Growth Factor Expression in Dental Pulp Cells. Journal of Endodontics 2007; 33(9): 1057-1060
3. Regulation of TGF- β on Biglycan Expression in Human Dental Pulp Cells จะนำเสนอในการประชุม นวัตกรรมรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส ครั้งที่ 4 วันที่ 11 – 13 ตุลาคม 2550 ที่ เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี

Different Roles of Dexamethasone on Transforming Growth Factor- β 1–induced Fibronectin and Nerve Growth Factor Expression in Dental Pulp Cells

Sirivimol Srisawasdi, DDS, MS, PhD,* and Prasit Pavasant, DDS, PhD†

Abstract

During pulp injury, it has been hypothesized that transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is released from dentin into pulp tissue and promotes pulp tissue healing. Dexamethasone is a glucocorticoid that has been used to treat pulp injury and shown to induce differentiation of hard tissue forming cells. However, the interaction between dexamethasone and TGF- β 1 is still unknown. This study aimed to examine the effects of dexamethasone on human pulp cells in the presence of TGF- β 1. TGF- β 1 increased expression and synthesis of both fibronectin and nerve growth factor (NGF), whereas dexamethasone stimulated fibronectin synthesis but inhibited NGF expression. The application of both TGF- β 1 and dexamethasone resulted in an additional effect on fibronectin; however, dexamethasone inhibited the TGF- β 1-induced NGF expression. Dexamethasone promotes fibronectin synthesis and suppresses NGF secretion, suggesting that this reagent could be used clinically to reduce pain and promote dental pulp tissue healing. (*J Endod* 2007;xx:xxx)

Key Words

Dexamethasone, nerve growth factor, transforming growth factor- β 1

From the Departments of *Operative Dentistry and †Anatomy, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Supported by the Thailand Research Fund (grant nos MRG4880129 and RSA4780007).

Address requests for reprints to Dr Sirivimol Srisawasdi, Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Henri Dunant Rd., Bangkok, Thailand 10330. E-mail address: dupn1048@truemail.co.th. 0099-2399/\$0 - see front matter

Copyright © 2007 by the American Association of Endodontists.

doi:10.1016/j.joen.2007.05.007

In the event of tooth injury and damaged primary odontoblasts, reparative dentin will be formed in response to injury. Under an optimal environment, dental pulp progenitor cells are induced to undergo differentiation and become odontoblast-like cells, which are subsequently responsible for dental pulp tissue repair (1). However, mechanisms and pathways of such differentiation are not fully understood. Elucidation of the process and mechanisms of dental pulp cell differentiation can help to find effective treatment for pulp injury by using biomolecules to signal and initiate differentiation of dental pulp progenitor cells into hard-tissue-forming cells (2, 3).

Dexamethasone is one of the steroids commonly studied, both in bone and dental pulp cells, as a potential agent for pulp treatment. Studies using bone cells showed that dexamethasone stimulated bone marrow stromal cells to differentiate into bone-forming cells via glucocorticoid responsive elements (GREs) (4–7). Dexamethasone enters cells by binding to the glucocorticoid receptor, moves into the nucleus, and subsequently binds to GREs, which is present on genes of several bone markers, such as bone sialoprotein and osteocalcin. Long-term treatment studies in human and rodents showed that dexamethasone promoted deposition of tertiary dentin (8, 9). In addition, dexamethasone, when used alone or in combination with other agents, such as vitamin D or basic fibroblast growth factor, could induce differentiation of both bone (10, 11) and dental pulp cells (12, 13) into hard-tissue-forming cells.

The mechanism of dental pulp cell differentiation has not been fully elucidated. Recently, Ye et al (14) found that hepatocyte growth factor stimulated both proliferation and differentiation of dental pulp cells partially through the ERK/MAPK pathway. However, it has been speculated that the stages of differentiation of dental pulp cells are similar to those of bone cells (11, 12).

Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) has been suggested to be released abundantly after tooth injury and has been suggested to be a crucial factor in regulating pulp response to dental caries (15). The comparison of gene expression between normal and injured pulp tissue indicated the increased expression of TGF- β 1 in pulp cells after injury; consequently, the presence of TGF- β 1 has been suggested to be essential for dental pulp tissue repair (15–18). Capping of the exposed pulp with TGF- β 1 has been shown to promote reparative dentin formation in a rat molar pulp-exposure model (19). However, interaction between TGF- β 1 and dexamethasone is still unknown.

The aim of this study was to determine the effects of dexamethasone on the expression of fibronectin and nerve growth factor (NGF) in human dental pulp cells, in the presence and absence of TGF- β 1. This information will help identify the possible role of dexamethasone in the dental pulp healing process.

Material and Methods

Dental Pulp Cell Culture

Dental pulp cells were obtained from healthy third molars, with informed consent, extracted for orthodontic purposes. The study protocol was approved by the Ethical Committee for Use of Parts From Human Body, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. The dental pulp cell culture was established as previously described (20). Cells from the third and fourth passages were used, and all experiments were performed in triplicate by using cells prepared from three different donors.

Treatment of Pulp Cells

Cells were seeded at a density of 25,000 cells/cm² for 16 hours. After starving in serum-free medium for 24 hours, cells were treated with either 200 nmol/L dexamethasone, 1 ng/mL recombinant TGF- β 1, or a combination of both dexamethasone and TGF- β 1.

RNA Extraction and Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction

RNA was extracted with TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) according to manufacturer's instructions. Each RNA sample was converted to complementary DNA by a reverse transcription using an avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) for 1.5 hours at 42°C. Subsequently, a polymerase chain reaction (PCR) was performed. The primers for fibronectin, NGF, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were prepared following the reported sequences from GenBank. The oligonucleotide sequences of the primers were as follows: fibronectin: forward, 5' GGA TCA CTT ACG GAG AAA CAG 3' and reverse, 5' GGA TTG CAT GCA TTG TGT CCT 3'; NGF: forward, 5' ATA CAG GCG GAA CCA CAC TCA G 3' and reverse, 5' GTC CAC AGT AAT GTT GCG GGT C 3'; and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: forward, 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT 3' and reverse, 5' TCA CAC CCA TGA CGA ACA TGG 3'.

PCR was performed by using Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) with a PCR volume of 25 μ L. The PCR working conditions were set at a denaturing for 1 minute at 94°C, primer annealing for 1 minute at 60°C, and chain elongation for 1.45 minutes at 72°C on a DNA thermal cycler (Tpersonal; Whatman Biometra, Goettingen, Germany). The amplified DNA was then electrophoresed on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide fluorostaining. An intensity of each band was determined by Scion Image analysis software (Scion Corporation, Frederick, MD).

Western Blot Analysis

Cells were extracted by using radio-immuno precipitation buffer (150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 50 mmol/L Tris pH 8.0) containing cocktail protease inhibitors (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). Equal amount of protein from each sample was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under a reducing condition on a 12% polyacrylamide gel. Subsequently, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Immobilon-P; Millipore Corporation, Bedford, MA). The membrane was stained overnight with primary antibody for fibronectin (Chemicon International, Temecula, CA) or β -actin (Chemicon International) at 4°C. After being extensively washed with PBS, the membrane was incubated with biotinylated-secondary antibody (Sigma Chemical Co) for 30 minutes at room temperature and peroxidase-conjugated streptavidin (Zymed, South San Francisco, CA) for 30 minutes, respectively. Protein bands were detected by using a commercial chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL). Band intensity was determined by Scion Image analysis software.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay

The amount of NGF in culture medium was measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Quantikine; R&D System, Minneapolis, MN) following the manufacturer's instruction. Triplicate assays per experiment were performed.

Results

The treatment of dental pulp cells with 200 nmol/L dexamethasone for 24 hours increased the expression of fibronectin messenger RNA (mRNA), detected by reverse-transcription PCR, and decreased NGF

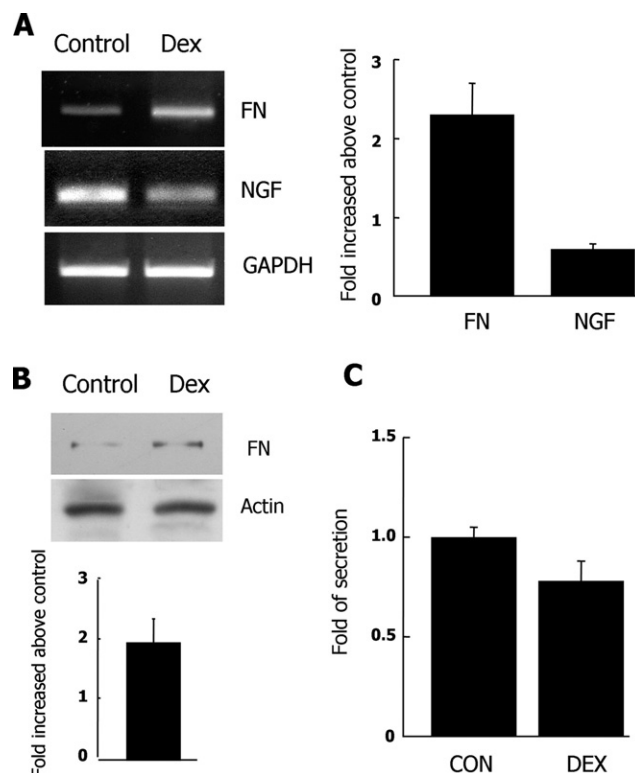


Figure 1. Dexamethasone induced fibronectin synthesis but reduced NGF secretion in dental pulp cells. Cells were treated with 200 nmol/L of dexamethasone for 24 hours. (A) The results from reverse-transcription PCR showed the effects of dexamethasone on the expression of fibronectin and NGF. The graph on the right shows the fold difference of expression (mean $\pm$ standard deviation [SD], control = 1) from three separate experiments. (B) The result from Western analysis of fibronectin from cell extract. The graph below revealed the mean $\pm$ SD of band density from three experiments. (C) The expression of NGF using ELISA (mean $\pm$ SD) from three experiments.

mRNA expression as shown in Figure 1A. The alteration in protein level was confirmed by Western analysis for fibronectin as shown in Figure 1B and ELISA for NGF as shown in Figure 1C. Dexamethasone increased fibronectin up to 2 folds above control; however, the same concentration of dexamethasone decreased NGF secretion.

The treatment of dental pulp cells with 1 ng/mL of TGF- β 1 for 24 hours increased the expression of both fibronectin and NGF mRNA as shown in Figure 2A. Western analysis revealed the up to six-fold increase in fibronectin synthesis after treatment as shown in Figure 2B. Similarly, TGF- β 1 induced approximately a two-fold increase in NGF secretion, determined by ELISA, as shown in Figure 2C.

The treatment of dental pulp cells with a combination of 200 nmol/L of dexamethasone and 1 ng/mL of TGF- β 1 increased fibronectin synthesis more than either of the reagents in isolation, as shown in Figure 3A. On the contrary, 200 nmol/L dexamethasone inhibited the NGF secretion induced by TGF- β 1 as shown in Figure 3B.

Discussion

Human dental pulp cells used in the present study contains mixed population of cells including dental pulp stem cells. Dental pulp stem cells are the resident cell population capable of tertiary dentinogenesis including dentin bridge formation. Our dental pulp cells express alkaline phosphatase, and, after being induced with dexamethasone, they could express dentin sialophosphoprotein, similar to that reported by Alliot-Licht et al (21). In addition, when these cells were cultured for 4

weeks in the presence of dexamethasone, they could differentiate into odontoblast-like cells, which concurs with the finding reported by Alliot-Licht et al (21) and Huang et al (22). It has been well documented that fibronectin can influence cell attachment, migration, and differentiation of several cell types (23, 24). In addition, fibronectin has been shown to participate in the process of dentinogenesis, both during development and repair (25–27). In rodent dental pulp tissue, an increasing level of fibronectin has been detected after cavity preparation (28). Increased fibronectin synthesis may help in the migration and proliferation of dental pulp cells to the site of injury. In vivo experiments indicated that fibronectin has been upregulated in pulp tissue after capping with calcium hydroxide preceding the healing process, therefore, emphasizing the importance of fibronectin in the healing process of pulp (29, 30). In this study, we found that TGF- β 1 upregulated fibronectin, a protein that plays an essential role in healing process, both in mRNA and protein levels. We also found that dexamethasone was capable of promoting fibronectin synthesis, suggesting that dexamethasone alone may possibly play a role in healing process of pulp tissue. In addition, dexamethasone has been shown to induce differentiation of pulp cell into odontoblast-like cell *in vitro* (22), which supports the role of dexamethasone in reparative dentin formation. An additional effect of dexamethasone and TGF- β 1 in fibronectin synthesis suggested that both reagents may regulate fibronectin synthesis via different pathways. Dexamethasone, in general, regulates gene expression by GRE, whereas TGF- β 1 uses the SMAD pathway. Detailed mechanism involved in the induction process needs further investigation.

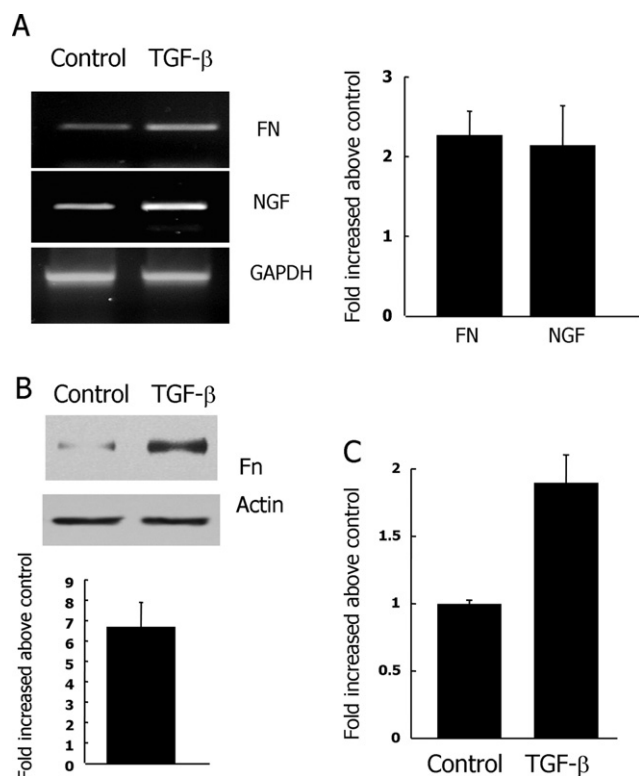


Figure 2. TGF- β 1 induced fibronectin and NGF expression in dental pulp cells. Cells were treated with 1 ng/mL of TGF- β 1 for 24 hours. Reverse-transcription PCR analyses of fibronectin and NGF were shown in Figure 2A, and the mean $\pm$ SD of band density from three separate experiments was shown in graph on the right (control = 1). (B) The result from Western analysis of fibronectin from cell extract. The graph below reveals the mean $\pm$ SD of band density from three experiments. (C) The results from ELISA as mean $\pm$ SD from three experiments.

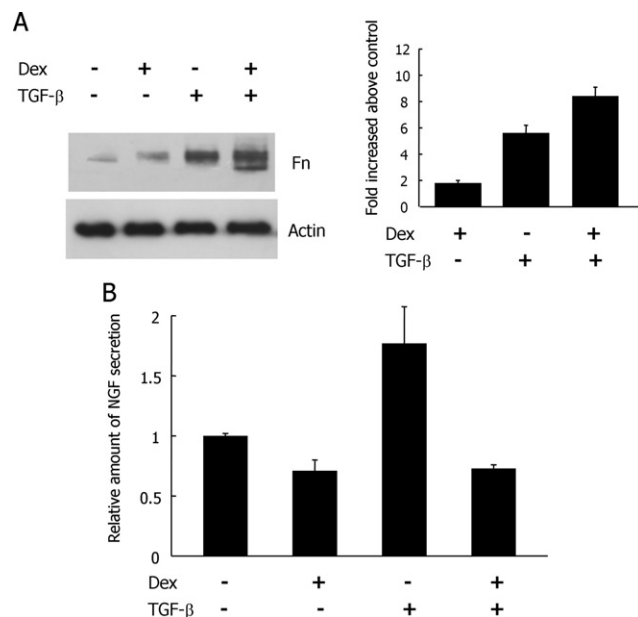


Figure 3. Combination effects of dexamethasone and TGF- β 1 on dental pulp cells. Cells were treated for 24 hours with either 200 nmol/L of dexamethasone alone or 1 ng/mL of TGF- β 1 alone or both reagents together. The changes in (A) protein level of fibronectin and (B) NGF were analyzed by Western analyses and ELISA, respectively.

An elevated level of NGF was also found in pulp tissues (31). NGF is a growth factor that has been shown to associate with sprouting and hypersensitivity of nerve endings in the area of injury, therefore, being responsible for pulpal pain and dentin hypersensitivity. Our recent finding showed that TGF- β 1 could stimulate the expression and secretion of NGF in a dose-dependent manner, implying that in the event of injury the abundantly present TGF- β 1 may induce more secretion of NGF (32).

The finding that dexamethasone inhibited the basal level of NGF is in agreement with others that showed that dexamethasone inhibited NGF expression in PC12 cell line and lowered the NGF receptor level in rat brain (33). Moreover, it was shown that interleukin 1-induced NGF expression in rat astrocytes was inhibited by dexamethasone (34). The findings of our investigation showed that dexamethasone inhibited TGF- β 1-induced NGF, suggesting that dexamethasone could be used to relieve tooth pain. However, this is the first time in which inhibitory effect of dexamethasone on NGF expression was observed in dental pulp cells.

In conclusion, dexamethasone promotes fibronectin synthesis and suppresses NGF secretion, both in the presence and absence of TGF- β 1, suggesting that dexamethasone may be an effective agent for clinical use to promote dental pulp tissue healing and reduce pulpal pain.

References

- Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res* 2001;15:51–4.
- Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 2000;28:77–92.
- Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent* 2000;28:153–61.
- Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SE, Avoli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994;134:277–86.
- Owen TA, Bortell R, Shalhoub V, et al. Post-proliferative transcription of the rat osteocalcin gene is reflected by vitamin D-responsive developmental modifications in protein-DNA interactions at basal and enhancer promoter elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1503–7.

6. Heinrichs AA, Bortell R, Rahman S, et al. Identification of multiple glucocorticoid receptor binding sites in the rat osteocalcin gene promoter. *Biochemistry* 1993;32:11436–44.
7. Ogata Y, Yamauchi M, Kim RH, Li JJ, Freedman LP, Sodek J. Glucocorticoid regulation of bone sialoprotein (BSP) gene expression. Identification of a glucocorticoid responsive element in the bone sialoprotein gene promoter. *Eur J Biochem* 1995;230:183–92.
8. Nasstrom K. Dentin formation after corticosteroid treatment. A clinical study and an experimental study on rats. *Swed Dent J Suppl* 1996;115:1–45.
9. Symons AL, Henry AC, Chang S, Daley TJ, Harbrow DJ, Joseph BK. The effect of glucocorticosteroid treatment on dentine formation in the Lewis rat, a histological study. *Growth Factors* 2000;18:157–67.
10. Ishida Y, Heersche JNM. Glucocorticoid-induced osteoporosis: both *in vivo* and *in vitro* concentrations of glucocorticoids higher than physiological levels attenuate osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 1998;13:1822–6.
11. Pri-Chen S, Pitaru S, Lokiec F, Savion N. Basic fibroblast growth factor enhances the growth and expression of the osteogenic phenotype of dexamethasone-treated human bone marrow-derived bone-like cells in culture. *Bone* 1998;23:111–7.
12. Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H. Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Arch Oral Biol* 1993;38:769–77.
13. Ferrari AM, Byers MR. Chronic dexamethasone treatment and its effects on sensory neuropeptides, pulpal injury reactions and reparative dentin. *Brain Res* 1996;723:125–34.
14. Ye L, Peng L, Tan H, Zhou X. HGF enhanced proliferation and differentiation of dental pulp cells. *J Endod* 2006;32:736–41.
15. Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGF- β 1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *J Dent Res* 2000;79:1689–96.
16. Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Tripodi D, Strocchi R. Transforming growth factor-beta 1 expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis. *Int Endod J* 2004;37:114–9.
17. McLachlan JL, Smith AJ, Sloan AJ, Cooper PR. Gene expression analysis in cells of the dentine-pulp complex in healthy and carious teeth. *Arch Oral Biol* 2003;48:273–83.
18. Wisithphrom K, Windsor LJ. The effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, and transforming growth factor-beta 1 on pulp fibroblast mediated collagen degradation. *J Endod* 2006;32:853–61.
19. Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod* 1998;24:744–51.
20. Pavasant P, Yongchaitrakul T, Pattamapun K, Arkornnukit M. The synergistic effect of TGF-beta and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on SPARC synthesis and alkaline phosphatase activity in human pulp fibroblasts. *Arch Oral Biol* 2003;48:717–22.
21. Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, et al. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res* 2005;321:391–400.
22. Huang GT, Shagrananova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin *in vitro*. *J Endod* 2006;32:1066–73.
23. Grinnell F. Fibronectin and wound healing. *J Cell Biochem* 1984;26:107–16.
24. Moursi AM, Globus RK, Damsky CH. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation *in vitro*. *J Cell Sci* 1997;110:2187–96.
25. Linde A, Johansson S, Jonsson R, Jontell M. Localization of fibronectin during dentinogenesis in rat incisor. *Arch Oral Biol* 1982;27:1069–73.
26. Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *J Dent Res* 1996;75:1590–7.
27. Lesot H, Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Mitolo V, Ruch JV. Epigenetic signals during odontoblast differentiation. *Adv Dent Res* 2001;15:8–13.
28. Izumi T, Yamada K, Inoue H, Watanabe K, Nishigawa Y. Fibrinogen/fibrin and fibronectin in the dentin-pulp complex after cavity preparation in rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86:587–91.
29. Tziafas D, Panagiotakopoulos N, Komnenou A. Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine or calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol* 1995;40:23–31.
30. Piva E, Tarquinio SB, Demarco FF, Silva AF, de Araujo VC. Immunohistochemical expression of fibronectin and tenascin after direct pulp capping with calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:e66–71.
31. Woodnutt DA, Wager-Miller J, O'Neill PC, Bothwell M, Byers MR. Neurotrophin receptors and nerve growth factor are differentially expressed in adjacent non-neuronal cells of normal and injured tooth pulp. *Cell Tissue Res* 2000;299:225–36.
32. Yongchaitrakul T, Pavasant P. TGF- β 1 up-regulates the expression of nerve growth factor through MAPK signaling pathway in dental pulp cells. *Eur J Oral Sci* 2007;115:57–63.
33. Yakovlev AG, De Bernardi MA, Fabrazzo M, Brooker G, Costa E, Mocchetti I. Regulation of nerve growth factor receptor mRNA content by dexamethasone: *in vitro* and *in vivo* studies. *Neurosci Lett* 1990;116:216–20.
34. Pshenichkin SP, Szekely AM, Wise BC. Transcriptional and posttranscriptional mechanisms involved in the interleukin-1, steroid, and protein kinase C regulation of nerve growth factor in cortical astrocytes. *J Neurochem* 1994;63:419–28.

Regulation of TGF- β on Biglycan Expression in Human Dental Pulp Cells.

Srisawasdi S.¹, Pavasant P.²

¹*Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

²*Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

Abstract

In the event of dental pulpal injury, TGF- β was shown to be abundantly present. Biglycan has been shown to involve in the process of dentin formation, therefore, it was chosen to be a marker indicating potential of pulp healing. The present study investigated roles of TGF- β in expression of biglycan in human primary pulp cell culture. Primary cultured human pulp cells were treated with various doses of TGF- β to simulate condition after injury. Non-treated groups were used as negative controls. Expression of biglycan was determined using RT-PCR. It was found that TGF- β induced biglycan mRNA within 1 hour, and the induction was in a dose- and time-dependent manner. The best responded-dose of 1 ng/mL was chosen for subsequent experiments. Application of SB505124, the specific inhibitor on the specific smad phosphorylation site on TGF- β receptor, inhibited the inductive effect of TGF- β , suggesting the smad-dependent pathway. Application of p-38 MAPK inhibitor, but not ERK inhibitor, also inhibited biglycan expression, suggesting the role of p-38 MAPK. Application of neutralizing antibody to α v β 3 integrin also abolished the inductive effect of TGF- β , suggesting the cross-talk between TGF- β and integrin on biglycan expression. In conclusion, TGF- β up-regulated expression of biglycan in human dental pulp, possibly via the pathways of smad 2, 3, integrin and p-38 MAPK, indicating the potential role of TGF-beta in pulp tissue healing.

Keywords: biglycan, human dental pulp cells, TGF-beta

Outputs

1. -

*Corresponding author.

Tel.: 0-2218-8794; Fax: 0-2218-8794

E-mail: dupn1048@truemail.co.th