



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อิทธิพลของ TGF- β และ SPARC ในกระบวนการซ่อมแซม
ของเนื้อเยื่อโครงฟันของมนุษย์

โดย รศ. ทพ. ประสิทธิ์ ภาวสันต์ และคณะ

สิงหาคม 2550



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อิทธิพลของ TGF- β และ SPARC ในกระบวนการซ่อมแซม
ของเนื้อเยื่อโครงฟันของมนุษย์

โดย รศ. ทพ. ประสิทธิ์ ภาวสันต์ และคณะ

สิงหาคม 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ อิทธิพลของ TGF- β และ SPARC ในกระบวนการซ่อมแซม
ของเนื้อเยื่อโครงกระดูกของมนุษย์

คณะผู้วิจัย

รศ. ทพ. ดร. ประสิทธิ์ ภาวสันต์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

รศ. ทญ. ทศนีย์ ยงชัยตระกูล ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

ผศ. ทญ. ดร. ศิริวิมล ศรีสวัสดิ์ ภาควิชาทันตกรรมหัตถการ

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive Summary

วัตถุประสงค์ของโครงการ

งานวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษากลไกการทำงานของ TGF- β และ SPARC ที่มีต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโครงฟัน ภายหลังการได้รับอันตราย เพื่อนำเอาไปประยุกต์ใช้ในการรักษาทางทันตกรรม โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน คือ

1. อิทธิพลของ TGF- β และ SPARC ต่อ การสร้างคอลลาเจนและไฟโบรเนกติน, การเคลื่อนที่ของเซลล์, การหลั่ง VEGF และ การกระตุ้นการสร้างและหลั่ง BMP-2
2. ความสัมพันธ์ระหว่าง TGF- β และ SPARC กับ NGF ในแง่ของการเหนี่ยวนำซึ่งกันและกันในการแสดงออกของ NGF และ TGF- β และ SPARC และ อิทธิพลของ TGF- β และ SPARC ต่อการเหนี่ยวนำการซ่อมแซมเนื้อเยื่อของ NGF

ผลการดำเนินการโดยสรุป

TGF- β สามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนคอลลาเจนและไฟโบรเนกตินในเซลล์โครงฟัน รวมทั้งสามารถกระตุ้นการหลั่ง รวมทั้งสามารถกระตุ้นการหลั่ง nerve growth factor (NGF) โดยกระตุ้นผ่านทาง MAPK 2 ชนิดคือ p38 kinase และ JNK และสัญญาณที่เกิดขึ้นมี crosstalk ร่วมกับ G-protein-coupled receptor

SPARC สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์โครงฟัน รวมทั้งกระตุ้นการสร้างโปรตีนไฟโบรเนกติน แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มระดับ mRNA ของไฟโบรเนกติน และสามารถเพิ่มการแสดงออกของ β 1 integrin การกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกติน รวมทั้งพบการเพิ่มขึ้นของระดับ อินทิกริน เบตา 1 แต่ไม่มีผลต่อการสร้างคอลลาเจน โดยสัญญาณทั้งหมดน่าจะเกิดผ่านการจับกันระหว่าง SPARC กับ α V β 3 integrin และผ่าน MAPK ชนิด ERK

โครงการ อิทธิพลของ TGF- β และ SPARC ในกระบวนการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อโพรงฟันของมนุษย์

บทคัดย่อ

TGF- β และ SPARC เป็นโปรตีนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อโพรงฟัน หลังจากฟันได้รับอันตราย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของ TGF- β และ SPARC ที่มีต่อพฤติกรรมของเซลล์โพรงฟัน โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์โพรงฟันจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของฟันกรามซี่ที่สาม ที่ถอนตามคำแนะนำของทันตแพทย์ และไม่มีรอยโรคของเหงือกและฟัน จากนั้นจึงกระตุ้นด้วย TGF- β และ SPARC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และศึกษาการเปลี่ยนแปลงดังนี้

ผลการกระตุ้นด้วย TGF- β พบว่าเซลล์จะมีการสร้างและหลั่ง nerve growth factor (NGF) เพิ่มขึ้น โดยพบได้ตั้งแต่ที่ 4 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น กลไกการทำงานของ TGF- β ในการกระตุ้น พบว่าเกิดผ่าน MAPK สองชนิดคือ p38 และ JNK นอกจากนี้ ยังพบว่าการทำงานของ TGF- β น่าจะมีความสัมพันธ์กับ G-protein coupled receptor ด้วย โดยสัญญาณจาก TGF- β receptor น่าจะเกิดผ่าน JNK ในขณะที่สัญญาณจาก G-protein coupled receptor น่าจะเกิดผ่าน p38 kinase

ผลการกระตุ้นด้วย SPARC พบว่า SPARC สามารถทำหน้าที่เป็น chemotactic factor ในการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์โพรงฟัน นอกจากนี้ ยังสามารถเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนไฟโบรเนคตินในแบบ post-transcriptional regulation และเหนี่ยวนำการเพิ่มขึ้นของ $\beta 1$ integrin ทั้งในระดับโปรตีนและ mRNA ผลการทดลองยังแสดงว่า SPARC น่าจะส่งสัญญาณผ่าน $\alpha V \beta 3$ integrin ที่ผิวเซลล์ และสัญญาณจาก $\alpha V \beta 3$ integrin ที่ผ่านมาทาง ERK จะเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และการสร้างไฟโบรเนคติน ส่วนสัญญาณที่ผ่านไปทาง JNK จะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแสดงออกของ $\beta 1$ integrin

ผลการทดลองทั้งหมด แสดงว่า TGF- β และ SPARC มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมของเซลล์โพรงฟัน โดยเฉพาะ SPARC น่าจะมีบทบาทในภากรกระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน ส่วนหน้าที่ของ TGF- β จากงานวิจัยครั้งนี้ สนับสนุนว่าน่าจะเกี่ยวข้องับสมดุลของสนับสนุนว่าน่าจะเกี่ยวข้องับสมดุลของ neurotrophic factor ในเนื้อเยื่อโพรงฟัน

The influence of TGF- β and SPARC in the healing process of human pulp tissue

Abstract

TGF- β and SPARC are molecules that found increased within pulp tissue after tooth injury. The aims of this study are to examine the influence of these two molecules on the behavior of dental pulp cells. Dental pulp cells were established from dental pulp tissue obtained from third molar extracted from the recommendation of the dentists. Cells were treated with either TGF- β or SPARC in various concentrations and examine the following results:

Addition of TGF- β in dental pulp cell culture resulted in the up-regulation of nerve growth factor (NGF) in a dose dependent manner. The increased of NGF could be observed within 4 hours. The results indicated that two MAPK, p38 kinase and JNK involved in the TGF- β -induced NGF. In addition, the results also suggest the crosstalk between TGF- β and G-protein coupled receptor signaling pathways. The signal from TGF- β receptor may pass through JNK while the signal from G-protein coupled receptor may go through p38 kinase.

Treatment of dental pulp cells with SPARC resulted in the induction of cell migration, suggesting the chemotactic property of SPARC. SPARC also induce fibronectin synthesis, post-transcriptionally. It also regulated the expression of β 1 integrin both in the mRNA and protein levels. The studies provided the evidence that SPARC may signal through α V β 3 integrin. Signal of SPARC through α V β 3 integrin and ERK involved in the regulation of cell migration and fibronectin synthesis, while the signal that go through JNK involve in the regulation of β 1 integrin.

In conclusion, both TGF- β and SPARC influence the behavior of dental pulp cells. In terms of SPARC, the evidences suggest that SPARC may participate in the healing process of dental pulp tissue. The function of TGF- β as found in these studies may involve in the homeostasis of neurotrophic factor in the pulp tissue.

บทนำ

โรคฟันผุเป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญทางทันตสาธารณสุข ผลของการเกิดฟันผุจะมีผลต่อเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเนื้อเยื่อโพรงฟัน (pulp tissue) โดยการเหนี่ยวนำการอักเสบขึ้นภายในโพรงฟัน และทำให้เซลล์โพรงฟันตอบสนองด้วยการพยายามซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยการสร้างเนื้อฟันชนิดดัดติยภูมิ (tertiary dentin or reparative dentin) พอกพูนขึ้นที่ผนังของโพรงฟันได้ต่อรอยผุ เพื่อป้องกันอันตรายจากแบคทีเรียที่อยู่ในรอยผุของฟัน

เซลล์ของเนื้อเยื่อโพรงฟัน (dental pulp cells) หรือที่จะเรียกต่อไปว่า เซลล์โพรงฟัน เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อโพรงฟัน การตอบสนองต่อการอักเสบ และการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน เมื่อเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อโพรงฟัน ไม่ว่าจะเกิดจากการผุ การหัก การกระแทก หรือการกรอฟันเพื่อการบูรณะฟัน อันตรายที่เกิดขึ้น มักจะทำอันตรายต่อเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) ทำให้เกิดการตายของเซลล์เหล่านี้ ซึ่งหากไม่มีการติดเชื้อ เซลล์โพรงฟันจะสามารถเปลี่ยนแปลงสภาพ (differentiate) เป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cells) และทำหน้าที่ซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน (Kakehashi et al., 1965; Yamamura, 1985)

จากความสามารถในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพได้ภายใต้การกระตุ้นที่เหมาะสมของเซลล์โพรงฟัน ไปเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเนื้อเยื่อแข็ง แสดงถึงคุณสมบัติที่คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์โพรงฟัน ซึ่งมีรายงาน รวมทั้งผลการทดลองที่ไม่ได้แสดงผลไว้ของคณะผู้วิจัยเองว่า เซลล์โพรงฟันนั้น มีการแสดงออกของ STRO-1 ซึ่งเป็น marker ของ mesenchymal stem cells (ไม่ได้แสดงผลการทดลองไว้)

อย่างไรก็ดี กลไกของกระบวนการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์โพรงฟันนั้น ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจน มีการนำเสนอเป็นข้อสมมติฐานว่า เซลล์โพรงฟันสามารถดิฟเฟอเรนซิเอตได้ด้วยตนเอง (autodifferentiate) (Yamamura, 1985) ทำให้แนวคิดในการทำงานทางทันตกรรม จะเป็นเพียงการกำจัดเอาส่วนเนื้อฟันที่ติดเชื้อออก และบูรณะตัวฟันเพื่อให้สามารถใช้งานได้ตามปกติ โดยทั้งการให้เซลล์โพรงฟันทำหน้าที่ซ่อมแซมตนเองด้วยกระบวนการตามธรรมชาติ ซึ่งในหลายๆ กรณี การซ่อมแซมที่เกิดขึ้นนั้น ไม่ได้เท่าที่ควร และเป็นผลให้การรักษานั้นล้มเหลวในที่สุด เนื่องจากกระบวนการดิฟเฟอเรนซิเอตที่เกิดขึ้นนั้น ย่อมต้องการปัจจัยกระตุ้นและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม การขาดความรู้และความเข้าใจในกระบวนการเหล่านี้ ทำให้การควบคุมผลของรักษาในทางทันตกรรมไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร

จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับพัฒนาการของฟันในระยะเริ่มแรก แสดงให้เห็นว่าในระหว่างพัฒนาการของเซลล์ dental mesenchyme ไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันนั้น จะเกิดควบคู่กับการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) รวมทั้งชนิดและปริมาณของโกรทแฟกเตอร์ (growth

factor) ที่สร้างโดยเซลล์ dental mesenchyme (Heine et al., 1987; Vaahtokari et al., 1991; Thesleff and Vaahtokari, 1992; Inage and Yoda, 1996) จากองค์ความรู้ดังกล่าว นำไปสู่ข้อสันนิษฐานที่เป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบันว่า เมทริกซ์นอกเซลล์และโกรทแฟกเตอร์เป็นสองปัจจัยสำคัญ ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการซ่อมแซมและการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟัน โดยมีรายงานว่าปัจจัยทั้งสองชนิดนี้ สามารถกระตุ้นการแบ่งตัว (proliferation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) และการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์หลายชนิดทั้งในระหว่างพัฒนาการ และในระหว่างการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อหลายชนิด รวมทั้งเนื้อเยื่อโพรงฟัน (Ruch et al., 1995; Tziafas and Papadimitriou, 1998)

แม้ว่าจะมีการศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยทั้งสองต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน แต่ผลที่ได้ก็ยังไม่ชัดเจนนัก ดังนั้น การศึกษาถึงอิทธิพลและผลของปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ที่มีต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน จะเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยให้การปรับปรุงการรักษาทางทันตกรรม โดยเฉพาะในการรักษาโรคฟันผุให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

Transforming growth factor beta หรือ TGF- β เป็นโกรทแฟกเตอร์ตัวหนึ่งที่มีบทบาทมากต่อการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ และการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟัน (Nagashima, 1992) โดยพบว่าเซลล์สร้างเนื้อฟันจะสร้าง TGF- β ในช่วงเวลาก่อนการสร้างเนื้อฟัน และ TGF- β จะเหนี่ยวนำการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์หลายชนิดในเซลล์โพรงฟัน (Inage and Yoda, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า TGF- β มีบทบาทสำคัญในการซ่อมแซมกระดูก (Joyce et al., 1990) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อนินทรีย์เช่นเดียวกับเนื้อฟัน

ผลการทดลองที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย (Pavasant et al., 2003) ได้แสดงให้เห็นว่า TGF- β สามารถทำงานร่วมกับ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ซึ่งเป็นสารที่มีอิทธิพลต่อการสร้างกระดูกและฟัน โดยกระตุ้นระดับของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อนินทรีย์ในเซลล์โพรงฟัน ผลการวิจัยพบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- β และ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ พร้อมๆกัน จะเพิ่มระดับเอนไซม์ขึ้นไปถึงกว่าสิบเท่าเมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วย $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ เพียงอย่างเดียว

นอกจากผลต่อเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสแล้ว คณะผู้วิจัยยังพบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วย TGF- β และ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ สามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีน Osteonectin/SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) ให้เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าการกระตุ้นด้วย TGF- β เพียงอย่างเดียวอีกด้วย SPARC เป็นโปรตีนที่พบได้มากในเนื้อฟันและกระดูก (Termine et al., 1981; Maillard et al., 1992; Begue-Kim et al., 1994; Takano-Yamamoto et al., 1994) และจากการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าบริเวณเมทริกซ์รอบเซลล์สร้างเนื้อฟันจะมีปริมาณของ SPARC สูงกว่าบริเวณอื่นๆของเนื้อเยื่อโพรงฟัน (Reichert et al., 1992; Tung et al.,

1985) นำไปสู่ข้อสันนิษฐานว่า SPARC น่าจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของเซลล์สร้างเนื้อฟัน นอกจากนี้ ระดับของ SPARC จะเพิ่มสูงขึ้นในระหว่างที่มีการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อหลายชนิดด้วย (Reed and Sage 1996) เกิดเป็นข้อสันนิษฐานว่าการเพิ่มขึ้น SPARC อาจสะท้อนถึงสภาวะการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อโพรงฟัน

จากผลการทดลองที่กล่าวถึงข้างต้น คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่า TGF- β และ SPARC น่าจะมีบทบาทต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยการเปลี่ยนแปลงระดับของการสร้างและหลั่งเมทริกซ์นอกเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงนี้จะนำไปสู่กระบวนการสร้างเนื้อฟันทดแทนโดยเซลล์ของโพรงฟัน

วิธีการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟัน

เซลล์โพรงฟันจะถูกเพาะเลี้ยงขึ้นจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย ตามที่เคยรายงานไว้แล้ว (Pavasant et al, 2003) ซึ่งมีวิธีโดยย่อคือ ฟันที่ได้จะถูกนำมาผ่าเป็นสองส่วน เพื่อดึงเอาเนื้อเยื่อโพรงฟันออกมา จากนั้นจึงตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปหว่านในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อเหงือกคือ ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ 10, กลูตามีน (glutamine), ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotics) อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุกวันจนเซลล์คลานออกจากชิ้นเนื้อ จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

เมื่อเซลล์ที่คลานออกจากชิ้นเนื้อเจริญจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะถูกถ่ายออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 หลังจากนั้นเซลล์จะถูกหว่านใหม่ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-5 และเซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อที่ได้จากคนไข้อย่างน้อย 3 คนในแต่ละการทดลอง

การกระตุ้นเซลล์

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน และ mRNA เซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6-well plate) ที่ความหนาแน่นประมาณ 20,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร หรือประมาณ 200,000 เซลล์/หลุม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มีซีรัม เพื่อลดผลของซีรัมให้น้อยที่สุด ในสถานะที่มีหรือไม่มีตัวกระตุ้นคือ TGF- β (recombinant human TGF- β 1 (Calbiochem, EMD Biosciences, Inc., La Jolla, CA) หรือ SPARC SPARC (from bovine bone; Calbiochem, San Diego, CA, USA) และเลี้ยงต่อไปตามระยะเวลาที่กำหนด

ในการใช้ตัวยับยั้งต่างๆ จะเติมตัวยับยั้งก่อนหน้าที่จะกระตุ้นด้วย TGF- β หรือ SPARC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารยับยั้งที่ใช้ในการทดลองได้แก่ actinomycin D (0.5 μ g/ml), cycloheximide (5 μ g/ml) จาก Sigma-Aldrich Chemical, extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor (ERK activator inhibitor peptide 1) (2.5 μ M), c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor (SP600125) (40 nM), SB203580 (p38 MAPK inhibitor), staurosporine (a serine/threonine kinase inhibitor), SB225002 (a G-protein coupled receptor inhibitor) (22 nM), suramin (15 μ M), Rho kinase inhibitor (1.2 nM) จาก

Calbiochem และ neutralizing antibody to $\alpha\text{V}\beta 3$ integrin (20 $\mu\text{g/ml}$), inhibitory antibody to $\beta 1$ integrin (20 $\mu\text{g/ml}$) จาก Chemicon® International

การวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนคตินและคอลลาเจนด้วยวิธีวิเคราะห์แบบเวสต์เทิร์น (Western blot analysis)

ในการวิเคราะห์หาไฟโบรเนคติน เซลล์และเมทริกซ์จะถูกทำละลาย (extracted) ด้วย radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris, pH 8.0) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีน โดยใช้ชุดวัดโปรตีน (BCA protein assay kit; Pierce)

สารละลายที่มีปริมาณโปรตีนที่เท่ากันจากแต่ละกลุ่มทดลอง จะถูกแยกด้วยไฟฟ้าในอะคริลามายด์ เจล (polyacrylamide gel electrophoresis) จากนั้นโปรตีนจะถูกถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) แล้วย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไฟโบรเนคติน (mouse monoclonal anti-fibronectin; Sigma) การตรวจสอบสัญญาณจะใช้วิธี auto-fluorography โดยการเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยชุดขยายสัญญาณแบบเคมี (Chemiluminescence reagent, Pierce) และตรวจจับสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ (CL-XPosure) สัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Scion Image analysis

ในการวิเคราะห์หาคอลลาเจน เซลล์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 วัน (ซึ่งเป็นเวลาที่น้อยที่สุดที่สามารถจับสัญญาณจากโปรตีนด้วยเทคนิค Western analysis ได้)

เมื่อครบระยะเวลา เซลล์และเมทริกซ์ถูกสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่าง Tris 50 มิลลิโมลาร์ และ NaCl 150 มิลลิโมลาร์โดยการเขย่าเบาๆตลอดเวลาเป็นเวลานานหนึ่งคืน จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 14,000 g เพื่อนำส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลายซึ่งมีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ไปสกัดด้วยเปปซินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในสารละลายกรดอะซิติก (acetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยการเขย่าเช่นเดียวกัน ลักษณะโครงสร้างที่เป็นเกลียว (triple helix) ซึ่งพบเฉพาะในคอลลาเจนจะคงเหลืออยู่โดยไม่ถูกย่อยสลายโดยเปปซินแต่อยู่ในรูปของสารละลายคอลลาเจน กระบวนการดังกล่าวข้างต้นทั้งหมดกระทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นคอลลาเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายเปปซิน (pepsin) ถูกทำให้แข็งด้วยความเย็นและนำไปทำให้แห้งโดยการไลโอไฟไลซ์ (lyophilization) จากนั้นคอลลาเจนที่ได้ถูกนำไปทำละลายด้วยเลียมคลอไรด์ (Laemmli buffer) ก่อนนำไปเปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนที่เซลล์สร้างขึ้นต่อหนึ่งจาน

เลี้ยงเซลล์ต่อไปภายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าและย้อมด้วยแอนติบอดีต่อคอลลาเจน (L-19, Santa Cruz Biotechnology) โดยเทคนิคเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ไฟโบรเนคตินข้างต้น

ส่วนการหาระดับของ active signaling molecule (phosphorylated form) โปรตีนจะถูกสกัดด้วย modified RIPA buffer (โดยการเติม phosphatase inhibitors ได้แก่ 1 mM sodium vanadate และ 50 mM NaF ส่วนแอนติบอดีที่ใช้ได้แก่ primary antibodies ต่อ phospho-p38 MAPK (1:1,000), phospho-JNK (1:1,500), total JNK (1:2,500), phospho-ERK1/2 (1:1,000), total ERK1/2 (1:1,000) จาก R&D systems และ total p-38 MAPK (1:200) จาก Santa Cruz Biotechnology

การวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR

RNA ถูกสกัด (extract) จากเซลล์ด้วยสารละลาย TRIzol (Gibco, USA) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัท จากนั้นวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร RNA จำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลองถูกนำไปผ่านกระบวนการรีเวอร์ส ทรานสคริปชัน (reverse transcription, RT) เพื่อสร้างคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ (complementary DNA) โดยใช้เอนไซม์ AMV (avian myeloblastosis virus) แล้วขยายสัญญาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Taq polymerase) และไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อ mRNA ของไฟโบรเนคติน คอลลาเจน และ NGF และใช้สัญญาณของ GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง (internal control) เพื่อการตรวจสอบว่าปริมาณของอาร์เอ็นเอตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน สัญญาณที่ได้จาก PCR ถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยไฟฟ้าในอกาโรสเจล (agarose gel) และอ่านความเข้มด้วยโปรแกรม Scion Image analysis

ลำดับของสายไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง คือ

GAPDH	Forward 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT 3'
	Reverse 5' TCA CAC CCA TGA CGA ACA TGG 3'
Fibronectin	Forward 5' GGA TCA CTT ACG GAG AAA CAG 3'
	Reverse 5' GAC ACT AAC CAC ATA CTC CAC 3'
Collagen α 1	Forward 5' CTG GCA AGA AGG CGG CAA A 3'
	Reverse 5' CTC ACC ACG ATC ACC ACT CT 3'
NGF	Forward 5' ATA CAG GCG CAA CCA CAC TCA G 3'

	Reverse 5' GTC CAC AGT AAT GTT GCG GGT C 3'
$\beta 1$ integrin	Forword 5' AGGAACAGCAGAGAAGCTCA
	Reverse 5' AGCCGTGTAACATTCCTCCA
$\alpha 5$ integrin	Forword 5' GCG CTC CAC TGT ACA GCT G 3'
	Reverse 5' CAG CAA GTC ATC CAG CCC G 3'

การย้อมหาปริมาณไฟโบรเนคตินด้วยแอนติบอดี (immunocytochemistry)

เซลล์ถูกตรึงด้วยเมทานอล บนน้ำแข็ง จากนั้นจึงย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนไฟโบรเนคติน (mouse monoclonal anti-fibronectin; Sigma) และย้อมซ้ำด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่มีสารฟลูออเรสซินเชื่อมต่ออยู่ จากนั้นจึงตรวจสอบสัญญาณด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ สัญญาณที่เป็น background จะตรวจสอบโดยการย้อมด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิโดยไม่ใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ

การวิเคราะห์หา NGF ด้วยวิธี ELISA

เซลล์ถูกหว่านลงในจานเลี้ยงแบบ 96 หลุม และทำการกระตุ้นเช่นเดียวกับการทดลองอื่นๆ จากนั้นจึงตรวจสอบด้วย NGF ELISA kit (R&D system) โดยตรวจสอบจากอาหารเลี้ยงเซลล์ ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัท และตรวจวัดสัญญาณด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ NGF E_{max}[®] ImmunoAssay Systems (Promega, Madison, WI)

การวัดความเป็นพิษด้วยเทคนิค MTT assay

MTT assay จะวัดตามวิธีที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว (Pattamapun, et al 2003) โดยเซลล์ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ที่ความหนาแน่น 25,000 เซลล์/ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 1 วัน จากนั้น กระตุ้นด้วย สารที่ต้องการทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใน 4 ชั่วโมงสุดท้ายของการกระตุ้น อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มี phenol red และมี MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติม DMSO (dimethylsulfoxide) 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึก formazan ที่เซลล์สร้างขึ้นจากสารละลาย MTT จากนั้นจึง

นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นจะแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นจำนวนเซลล์ตามกราฟมาตรฐาน และปรับเป็นจำนวนร้อยละของเซลล์

การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์

เซลล์ถูกหว่านลงใน 48 well chemotaxis chamber a 48-well chemotaxis chamber (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA). ซึ่งเป็นเครื่องมือในการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ในแนวดิ่งเข้าหาสารที่สามารถดึงดูดเซลล์ เซลล์ถูกหว่านที่ความหนาแน่น 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณ 56 ไมโครลิตร/หลุม (~56,000 cells เซลล์ต่อหลุม) ลักษณะของ apparatus จะแบ่งออกเป็น 2 ชั้น โดยมีแผ่นเมมเบรนที่มีรูพรุนคั่นกลาง เซลล์ถูกหว่านลงใน upper chamber ส่วนใน lower chamber จะเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี SPARC ที่ความเข้มข้นต่างๆ จาก 0-5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ใน upper chamber เคลื่อนผ่านแผ่นเมมเบรนไปยัง lower chamber จากนั้นจึงตรึงด้วยสารละลายฟอร์มาลิน ความเข้มข้น ร้อยละ 3.7 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงตัดแผ่นเมมเบรนออกจาก apparatus และนำมาย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิดิน พร้อมกับเขี่ยเซลล์ส่วน upper chamber ออก คงเหลือไว้แต่เซลล์ใน lower chamber จากนั้นนำมานับจำนวนเซลล์ที่อยู่ด้านล่างของเมมเบรนภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทำ co-immunoprecipitation

เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจึงสกัดโปรตีนด้วย M-per lysis buffer (Pierce) นำโปรตีนที่สกัดได้มา ทำ Co-immunoprecipitation โดยใช้ Profound™ Co-Immunoprecipitation kit (Pierce) ตามวิธีการที่ระบุในคู่มือ ดังนี้ โปรตีนจะถูกบ่มด้วยแอนติบอดีต่ออินทิกริน αV (rabbit anti-integrin αV polyclonal antibody, cytosolic epitope, Chemicon) ที่ถูกยึดไว้กับเม็ดโปรตีน A เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วสกัดโปรตีนที่เกาะติดกับเม็ดโปรตีน A ด้วย elution buffer แล้วจึงนำมาแยกด้วยไฟฟ้า และย้อมด้วยแอนติบอดีต่ออินทิกริน αV และแอนติบอดีต่อ SPARC (mouse anti-osteonectin/SPARC monoclonal antibody, Zymed)

ตอนที่ 1 ผลของ TGF- β ต่อเซลล์โพรงฟัน

ดังกล่าวแล้วว่า Transforming growth factor- β เป็นโกรทแฟคเตอร์ตัวหนึ่งที่มีบทบาทมากต่อการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ และการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟัน (Nagashima, 1992) และจากรายงานที่แสดงว่าเซลล์สร้างเนื้อฟันได้สร้างและสะสม TGF- β ไว้ในปริมาณที่สูงภายในเนื้อฟันระหว่างการสร้างเนื้อฟัน (D'Souza et al., 1998) ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่า TGF- β น่าจะเป็นสารหลักที่มีความสำคัญอย่างมากในการกระตุ้นการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยจะปล่อย TGF- β ออกมาสู่เนื้อเยื่อโพรงฟันเมื่อฟันได้รับอันตราย นอกจากนี้ เนื้อเยื่อโพรงฟันยังอาจได้รับ TGF- β ที่หลั่งออกมาเป็นจำนวนมากจากเกล็ดเลือดที่แข็งตัว (Centrella et al., 1986) ในกรณีที่เกิดการฉีกขาดของหลอดเลือดจากอันตรายที่เกิดกับเนื้อเยื่อโพรงฟัน

โดยทั่วไปแล้ว TGF- β เป็นโกรทแฟคเตอร์ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ได้หลายด้าน ตั้งแต่การกระตุ้นการแบ่งตัว การกระตุ้นและควบคุมการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ ตลอดจนการเหนี่ยวนำการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์หลายชนิด รวมทั้งเซลล์ของกระดูกและเนื้อฟัน (Heine et al., 1987; Kim and Ballock, 1993; Vaahtokari et al., 1991; Inage and Toda, 1996) และยังพบว่าเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่พบได้มากที่สุดทั้งในกระดูกและฟันด้วย (Akhurst, 1994; Finkelman et al., 1990; Cassidy et al., 1997)

ในระหว่างพัฒนาการของฟัน สัญญาณของ TGF- β จะเริ่มปรากฏในเนื้อฟันตั้งแต่ในระยะเริ่มต้น (bud stage) โดยพบการแสดงออกของ TGF- β ทั้งในเซลล์ของ dental epithelium ที่จะพัฒนาไปเป็นเคลือบฟัน และใน dental mesenchyme ที่จะพัฒนาไปเป็นเนื้อฟันและเนื้อเยื่อโพรงฟัน (Lehnert and Akhurst, 1988) จากนั้น ในเนื้อฟันระยะถัดมา (bell stage) จะพบ TGF- β ในเซลล์เกือบทุกส่วนของเนื้อฟัน รวมทั้งเซลล์สร้างเคลือบฟัน (mature ameloblast), เซลล์ของ dental papilla และเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Heine et al., 1987; Lehnert and Akhurst, 1988; Vaahtokari et al., 1991; Thesleff and Vaahtokari, 1992; Inage and Toda, 1996) โดยใน dental papilla สัญญาณของ TGF- β จะสูงมากในเซลล์สร้างเนื้อฟัน (D'Souza et al., 1998) ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่า TGF- β น่าจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์สร้างเนื้อฟัน โดยมีรายงานของ Ruch และคณะในปี 1995 สนับสนุน เมื่อคณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ พบว่า TGF- β สามารถเหนี่ยวนำเซลล์ของ dental papilla ในห้องปฏิบัติการให้เจริญเป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันได้

นอกจากบทบาทของ TGF- β ในระหว่างพัฒนาการของฟัน แล้ว ยังมีรายงานว่า TGF- β ยังมีบทบาทในฟันที่สร้างเสร็จสมบูรณ์แล้วด้วย โดยจะพบมีการแสดงออกของ TGF- β ในเนื้อเยื่อโพรงฟันของฟันที่สร้างเสร็จสมบูรณ์แล้ว (D'Souza et al., 1990; Nakashima et al., 1998) และมีงานวิจัยที่แสดงว่า TGF- β น่าจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นและควบคุมการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ของเซลล์โพรงฟัน (Nakashima,

1992; Shirakawa et al., 1994; Shiba et al., 1998) การกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน (Tziafas and Papadimitriou, 1998; Tziafas et al., 1998) และการรักษาสมดุลภายในเนื้อเยื่อโพรงฟัน (D'Souza et al., 1998) อย่างไรก็ตาม รายงานถึงผลโดยตรงของ TGF- β ที่มีต่อเซลล์โพรงฟันส่วนใหญ่ยังคงเป็นรายงานในสัตว์ทดลอง

ในกรณีของการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน มีหลักฐานในสัตว์ทดลองแสดงว่า TGF- β สามารถเหนี่ยวนำการเกิดเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Tziafas and Papadimitriou, 1998; Tziafas et al., 1998; Hu et al., 1998) ผลจากการทดลองในหนู พบว่าเมื่อปิดรอยทะลุของโพรงฟันด้วย TGF- β หรือ dentin extract จะสามารถกระตุ้นการสร้างเนื้อฟันทดแทนได้ และการกระตุ้นนี้จะถูกยับยั้งเมื่อใช้แอนติบอดีต่อ TGF- β (Tziafas et al., 1998) ซึ่งสนับสนุนบทบาทของ TGF- β ในการซ่อมแซมเนื้อฟัน อย่างไรก็ตาม รายละเอียดของกลไกการทำงานของ TGF- β ในการกระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟันนั้น ยังไม่มีความชัดเจน

Nerve growth factor (NGF) เป็นโกรทแฟคเตอร์อีกตัวหนึ่งที่มีบทบาทอย่างมากหลังจากที่ฟันได้รับอันตราย NGF เป็นโปรตีนในกลุ่มของ นิวโรโทรฟิน (Neurotrophins) ซึ่งเป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดเล็ก ที่มีบทบาทในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ประสาท ช่วยในการดำรงชีวิต ตลอดจนการดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์ประสาท (Leve-Montalcini, 1987) รายงานโดย Byers (1992a; 1992b) พบว่าหลังจากการกรอฟัน ระดับของ NGF ในเนื้อเยื่อโพรงฟันจะสูงขึ้นอย่างมากได้ต่อบริเวณที่เนื้อฟันได้รับอันตราย ผลของ NGF จะเหนี่ยวนำให้ปลายประสาทแตกแขนง ทำให้ความไวต่อการตอบสนองต่อสิ่งเร้าของเนื้อเยื่อโพรงฟันเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ NGF ยังมีผลในการขยายหลอดเลือดขนาดเล็กของเนื้อเยื่อโพรงฟัน ทำให้มีการรั่วของผนังหลอดเลือด และมีการคั่งของของเหลวในเนื้อเยื่อโพรงฟัน ซึ่งจะกระตุ้นกระบวนการอักเสบขึ้น ซึ่งเชื่อกันว่า กลไกที่เกิดขึ้นนี้ เป็นหนึ่งในกลไกป้องกันตนเองของเนื้อเยื่อโพรงฟัน แต่หากการตอบสนองนี้ รุนแรงมาก สภาวะของการอักเสบอาจเป็นแบบที่ไม่กลับคืน (irreversible) ทำให้เกิดการปวดอย่างรุนแรงได้ (Olgart and Kerezoudis, 1994; Byers and Narhi, 1999)

นอกจากบทบาทดังกล่าวข้างต้น ยังมีรายงานที่แสดงว่า NGF น่าจะเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อหลายชนิด โดยเฉพาะแผลของผิวหนัง (Matsuda et al., 1998; Micera et al., 2001; Kohyama et al., 2003; Nathya et al., 2003) อย่างไรก็ตาม บทบาทของ NGF ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน ยังคงเป็นเพียงข้อสันนิษฐาน โดยที่ยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจน และจากการที่พบการเพิ่มขึ้นทั้ง TGF- β และ NGF เพิ่มสูงขึ้นอย่างมากในเนื้อเยื่อโพรงฟันหลังจากได้รับอันตราย จึงเพิ่มความเป็นไปได้ที่ทั้ง TGF- β และ NGF จะมีส่วนร่วมกันในการกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อโพรงฟัน

จากบทบาทของ NGF ในการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อยึดต่อ คณะผู้วิจัยจึงตั้งข้อสมมติฐานว่า NGF น่าจะมีส่วนร่วมกับ TGF- β และ SPARC ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน เพื่อนำไปสู่การสร้างเนื้อฟันทดแทน และการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อโพรงฟันด้วย

ความรู้ความเข้าใจในบทบาทของ TGF- β และ SPARC ที่มีต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน จะสามารถนำไปประยุกต์เพื่อปรับปรุงเทคนิค หรือวัสดุทางทันตกรรม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการให้การรักษาทันตกรรมต่อไป

ผลการทดลอง

ก. ผลของ TGF- β ต่อการสร้างไฟโบรเนคตินและคอลลาเจน

ในการทดสอบผลของ TGF- β ต่อการเปลี่ยนแปลงของไฟโบรเนคตินและคอลลาเจน แสดงไว้ในรูปที่ 1 ผลการทดลองแสดงว่า TGF- β กระตุ้นการแสดงออกของไฟโบรเนคตินและคอลลาเจน

เซลล์โพรงฟันถูกกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสภาวะที่ไม่มีซีรัม เป็นเวลา 1 คืน (16 ชั่วโมง) ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของไฟโบรเนคตินและคอลลาเจน พบว่า TGF- β สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิด ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน

ในรูปที่ 1 A เป็นผลการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิดในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้การแสดงออกของ GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) เป็น internal control

ส่วนรูป 1B เป็นผลของการวิเคราะห์ระดับโปรตีนด้วยเทคนิค western analysis และผลการทดสอบพบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนในลักษณะเดียวกับที่พบใน จากรูป 1 A

ในภาพ 1B ตัวเลขทางซ้าย เป็นตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนัก และน้ำหนักของคอลลาเจน ชนิดที่ 1 สายอัลฟา 1 จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 190 กิโลดาลตัน ส่วนไฟโบรเนคติน จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 220 กิโลดาลตัน

ผลการทดลองนี้ ตรงกับรายงานจำนวนมากที่แสดงถึงความสามารถของ TGF- β ในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนในเซลล์หลายชนิด (Leonard et al., 1991; Begue-Kirn et al., 1992) ซึ่งสนับสนุนแนวคิดที่แสดงว่า TGF- β น่าจะมีบทบาทในการกระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโดยเฉพาะเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยการกระตุ้นการสร้างโปรตีนคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของเนื้อเยื่อโพรงฟัน และกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนคติน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ และสนับสนุนการหายของบาดแผล

ความสามารถของ TGF- β ในการกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนคติน ในเซลล์โพรงฟัน ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และผู้วิจัยได้รายงานไว้ใน Srisawasdi and Pavasant, J Endod 2007 In Press

ข. ผลของ TGF- β ต่อการแสดงออกของ Nerve growth factor (NGF)

ในการทดลองส่วนต่อมา เป็นการทดสอบผลของ TGF- β ต่อการแสดงออกของ NGF เนื่องจากมีรายงานที่แสดงการเพิ่มขึ้นของ NGF ภายในเนื้อเยื่อโพรงฟันอย่างรวดเร็วภายหลังฟันได้รับอันตราย

เมื่อกระตุ้นเซลล์โพรงฟันด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า TGF- β สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ NGF ได้โดยการกระตุ้นจะแปรผันตามความเข้มข้นของ NGF (รูปที่ 2) ซึ่งเมื่อทำการวัดปริมาณโปรตีน NGF ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธี ELISA พบว่าได้ผลในทิศทางเดียวกับ mRNA

ผลการทดลองในรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่า TGF- β สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ NGF ได้ตั้งแต่ที่ 4 ชั่วโมงแรกหลังการกระตุ้น และผลจากการวัดโปรตีน ก็ได้ผลในทิศทางเดียวกัน

ในการทดลองต่อมา เป็นการใช้อยู่ในกลุ่ม MAPK (mitogen associated protein kinase) ได้แก่ ตัวยับยั้งต่อ p38 kinase, ERK (extracellular signal-regulated kinase) และ JNK (c-Jun N-terminal kinase) เพื่อศึกษากลไกการกระตุ้น NGF โดย TGF- β

ผลการทดลองในรูปที่ 4 แสดงว่า TGF- β กระตุ้นการสร้างและหลั่ง NGF ผ่านทาง p38 kinase และ JNK โดยตัวยับยั้งทั้งสองชนิด สามารถยับยั้งการสร้างและหลั่ง NGF จากการกระตุ้นด้วย TGF- β ได้อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อตรวจสอบระดับของ active p38 และ active JNK (phosphorylated form) พบว่ามีระดับเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย TGF- β ดังแสดงผลในรูปที่ 5

การกระตุ้น NGF โดย TGF- β ยังสามารถยับยั้งได้ด้วย staurosporin ซึ่งแสดงว่า กลไกที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับ serine/threonine kinase (ซึ่งเป็น kinase ชนิดเดียวกับ kinase จากตัว TGF- β receptor เอง) และสามารถยับยั้งได้ด้วย SB225002 ซึ่งเป็น G-protein-coupled receptor inhibitor แสดงถึงความเกี่ยวพันของสัญญาณจาก TGF- β กับสัญญาณจาก G-protein receptor (รูปที่ 6)

เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่าง สัญญาณจาก p38 และ JNK กับสัญญาณของ serine/threonine kinase (หรือที่คาดว่าเป็นสัญญาณจาก TGF- β receptor) และสัญญาณจาก G-protein receptor เซลล์โพรงฟัน จะถูกกระตุ้นด้วย TGF- β ในสภาวะที่เติมตัวยับยั้งต่อ serine/threonine kinase และ

ต่อ G-protein-coupled receptor เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงตรวจสอบระดับของ active p38 และ active JNK ผลการทดลองในรูปที่ 7 แสดงว่า ตัวยับยั้งต่อ G-protein-coupled receptor ยับยั้งการเกิด active p38 ในขณะที่ตัวยับยั้งต่อ serine/threonine kinase ยับยั้งการเกิด active JNK

บทวิจารณ์

ในระหว่างการสร้างเนื้อฟันเซลล์สร้างเนื้อฟันจะสร้าง TGF- β จำนวนมากและเก็บไว้ในเนื้อฟัน และเมื่อเกิดอันตรายต่อฟัน TGF- β จะถูกปล่อยออกจากเนื้อฟันเข้ามาในเนื้อเยื่อโพรงฟัน ผลการทดลองครั้งนี้ ที่แสดงว่า TGF- β สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ NGF ได้ภายใน 4 ชั่วโมง สอดคล้องกับรายงานที่แสดงว่าระดับของ NGF เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อโพรงฟัน หลังจากฟันได้รับอันตราย (Byers et al., 1992)

NGF ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทภายในเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยสามารถกระตุ้นให้ปลายประสาทมีความไวต่อสิ่งเร้ามากขึ้น (hypersensitivity) ซึ่งเป็นกลไกป้องกันตัวเองของเนื้อเยื่อโพรงฟัน นอกจากนี้ ยังพบว่า NGF มีบทบาทในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อด้วย (Centrella et al., 2002; Lambiasi et al., 2000) บทบาทของ NGF ต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน อยู่ในระหว่างการศึกษาเพิ่มเติม

สัญญาณจาก TGF- β จะส่งผ่านเข้าเซลล์ผ่านทาง TGF- β receptor โดยจะไปกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Smad โดยเฉพาะ Smad 2 และ Smad 3 จากนั้น active Smad2/3 จะจับกับ Smad4 เกิดเป็น trimolecular complex ที่สามารถผ่านเข้าในนิวเคลียส และทำหน้าที่เป็น transcription factor โดยการกระตุ้น Smad ที่ตรง cytoplasmic tail ของ receptor จะเป็น kinase ชนิด serine/threonine kinase (Massague 2000a, b)

อย่างไรก็ดี มีรายงานว่า สัญญาณของ TGF- β อาจเกิดในลักษณะที่เป็น Smad independent โดยสัญญาณจะผ่านไปทาง signaling molecules อื่นๆ เช่น MAPK เป็นต้น (Shi et al., 2003) ซึ่งในทดลองครั้งนี้พบว่าสัญญาณของ TGF- β receptor จะผ่าน JNK ก่อนไปควบคุมการแสดงออกของ NGF และการที่ staurosporin ซึ่งเป็น serine/threonine kinase สามารถยับยั้งการแสดงออกของ NGF ได้ เกิดเป็นข้อสมมติฐานว่า สัญญาณจาก TGF- β receptor น่าจะผ่าน Smad ก่อน แล้วจึงผ่านต่อไปยัง JNK ก่อนไปควบคุมการแสดงออกของ NGF

การที่ G-protein coupled receptor inhibitor สามารถยับยั้งการแสดงออกของ NGF ได้ แสดงว่ามี crosstalk เกิดขึ้นระหว่าง TGF- β receptor กับ G-protein coupled receptor ซึ่งความสัมพันธ์ในลักษณะนี้เคยมีรายงานแล้ว เช่น รายงานของคณะผู้วิจัยเอง ได้รายงานถึง crosstalk ระหว่าง TGF- β กับ 1,25

dihydroxyvitamin D (Pavasant et al., 2003) และรายงานของ Kim และคณะ ได้รายงานถึง crosstalk ระหว่างสัญญาณของอินทิกรินกับ TGF- β receptor (Kim et al., 2004) โดยในการทดลองนี้ พบว่า Crosstalk ที่เกิดขึ้นนี้ จะส่งผ่านสัญญาณไปทาง p38 kinase อย่างไรก็ดี รายละเอียดของความสัมพันธ์นี้ จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

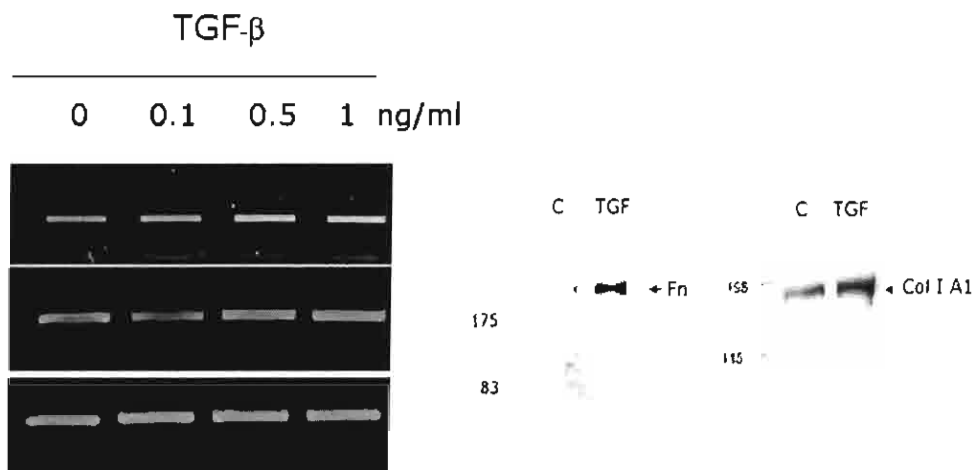


Figure 1

รูปที่ 1 ผลของ TGF- β ต่อการแสดงออกของไฟโบรเนคตินและคอลลาเจนในเซลล์โพรงฟัน

ภาพทางซ้าย แสดงผลของ เซลล์โพรงฟันที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้น 0 - นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจสอบระดับการแสดงออกของไฟโบรเนคตินและคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลการทดลองพบว่าระดับการแสดงออกของทั้งไฟโบรเนคตินและคอลลาเจนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ TGF- β ที่ใช้กระตุ้นเมื่อเทียบกับการแสดงออกของ GAPDH ที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน

ภาพทางขวาแสดงผลเมื่อกระตุ้นด้วย TGF- β ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามเวลาที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนไฟโบรเนคตินและคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ด้วยวิธี Western analysis พบว่ามีการสร้างโปรตีนทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเพิ่มระดับ mRNA

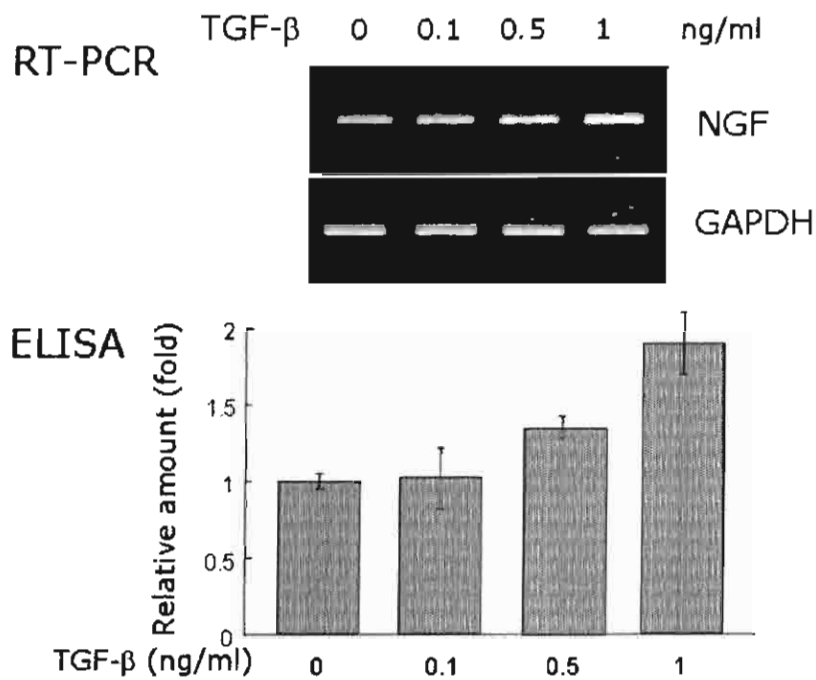
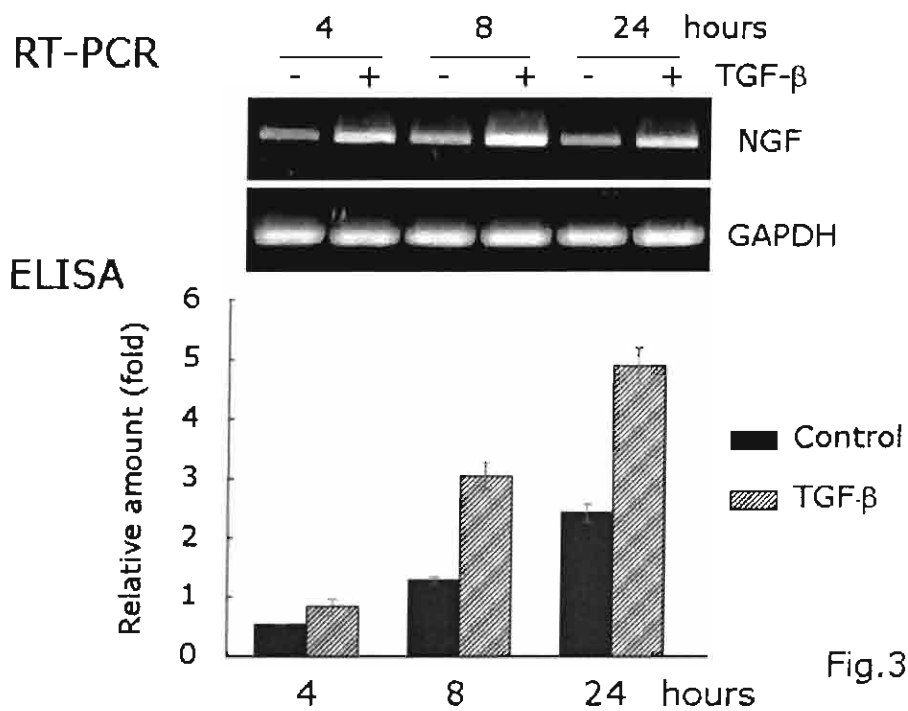


Fig.2

รูปที่ 2 ผลของ TGF- β ต่อการแสดงออกของ nerve growth factor (NGF) ในเซลล์โพรงฟัน

ภาพบนแสดงผลของ TGF- β ที่ความเข้มข้น 0.1 – 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ที่มีต่อเซลล์โพรงฟัน หลังกระตุ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า TGF- β กระตุ้นการแสดงออกของ NGF แปรผันตามความเข้มข้นที่ใช้ เมื่อตรวจสอบระดับ mRNA

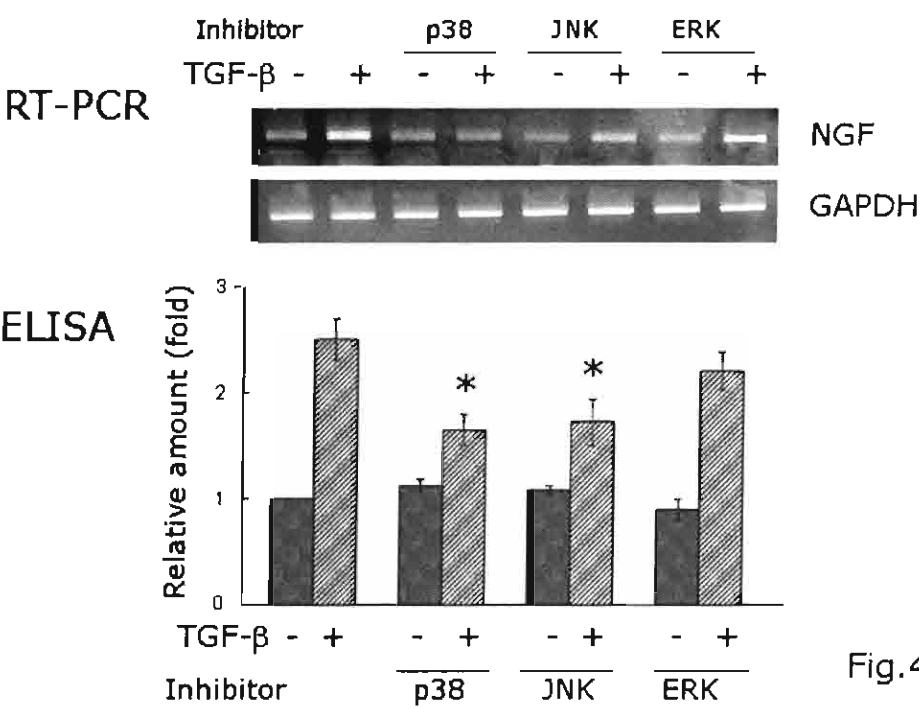
ภาพล่างแสดงระดับของ NGF ที่หลังจากเซลล์หลังถูกกระตุ้นด้วย TGF- β เมื่อวัดด้วยวิธี ELISA ซึ่งสอดคล้องกับผลของระดับ mRNA ในภาพบน



รูปที่ 3 ผลของ TGF- β ต่อ NGF ที่ระยะเวลาต่างๆ

ภาพบนแสดงผลของ TGF- β ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ต่อเซลล์โพรงฟัน หลังกระตุ้นเป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง พบว่า TGF- β สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ NGF ได้ตั้งแต่ที่ 4 ชั่วโมง

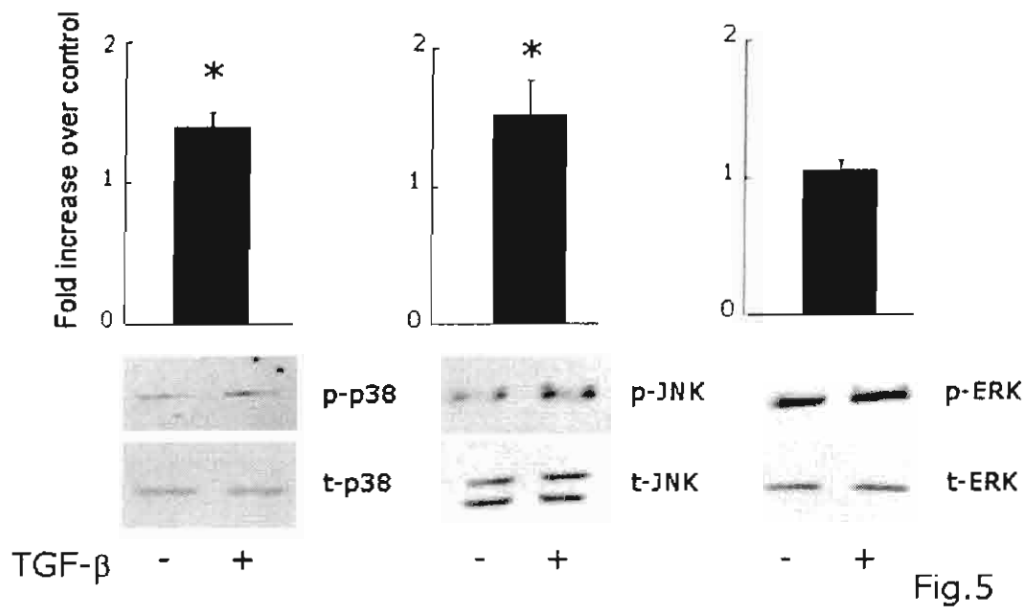
ภาพล่างแสดงระดับของโปรตีนเมื่อวัดด้วยวิธี ELISA ซึ่งผลสอดคล้องกับระดับ mRNA ในภาพบน



รูปที่ 4 ผลของ TGF-β NGF ถูกยับยั้งได้ด้วย MAPK inhibitors

ภาพบนแสดงผลของ TGF-β ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในการกระตุ้นการแสดงออกของ NGF ในสภาวะที่มี หรือไม่มี MAPK inhibitors 3 ชนิด คือ p38 inhibitor, JNK inhibitor และ ERK inhibitor และตรวจสอบระดับ mRNA พบว่าการเติม p38 และ JNK inhibitors สามารถยับยั้งผลการกระตุ้น NGF ของ TGF-β ได้อย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $p < 0.05$)

ภาพล่างแสดงระดับของโปรตีน NGF ที่วัดด้วยวิธี ELISA ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลจาก mRNA



รูปที่ 5 ผลของ TGF-β ในการกระตุ้น MAPK ในเซลล์โพรงฟัน

เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงสกัดโปรตีน และตรวจสอบระดับของ phosphorylated p38, JNK และ ERK (p-p38, pJNK, pERK) ซึ่งแสดงถึงระดับโปรตีนที่ถูกกระตุ้น ตามที่แสดงในรูปด้านล่าง และความเข้มของรูปจะถูกวิเคราะห์เทียบกับความเข้มของ total p38, JNK และ ERK (t-p38, t-JNK, t-ERK) โดยเทียบให้กลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 ผลการทดลองพบว่า TGF-β สามารถกระตุ้น p-p38 และ p-JNK

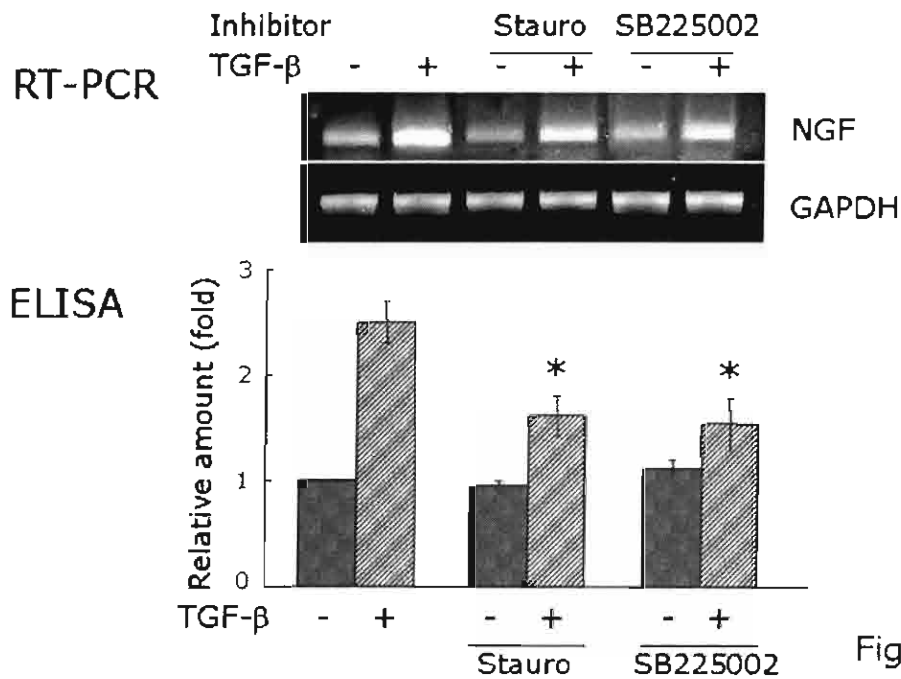


Fig.6

รูปที่ 6 ผลของ staurosporin และ SB225002 ต่อการกระตุ้น NGF

เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีหรือไม่มี staurosporin (serine/threonine kinase inhibitor) และ SB225002 (G protein coupled receptor inhibitor) จากนั้นจึงจึงตรวจสอบการแสดงออกของ NGF พบว่าทั้ง staurosporin และ SB225002 สามารถยับยั้งผลของ TGF- β ในการกระตุ้น NGF ได้อย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $p < 0.05$)

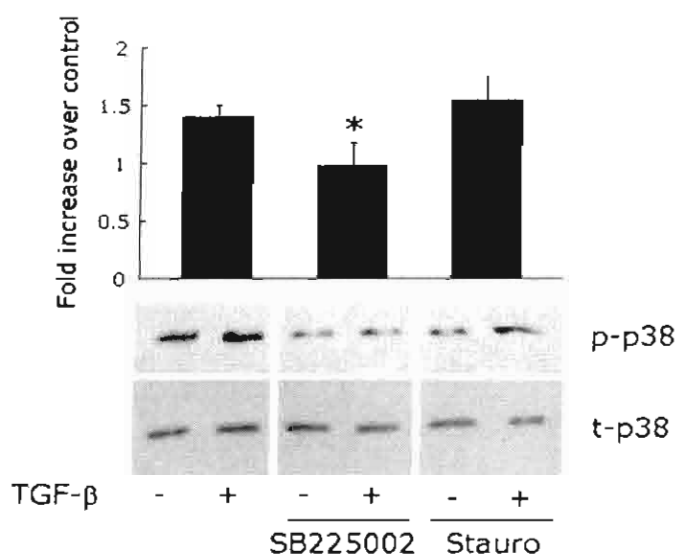


Fig.7A

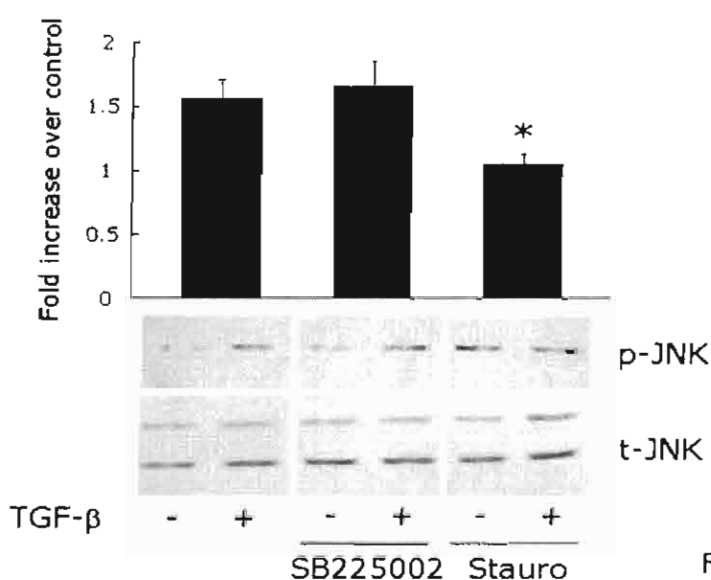


Fig.7B

รูปที่ 7 Staurosporin และ SB225002 สามารถยับยั้งผลของ TGF-β ในการกระตุ้น MAPK

เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ในสถานะที่มี หรือไม่มี staurosporin และ SB225002 จากนั้นจึงตรวจสอบระดับของ phosphorylated p38 (7A) และ phosphorylated JNK (7B) และความเข้มของรูปจะถูกวิเคราะห์เทียบกับความเข้มของ total p38 และ total JNK โดยเทียบให้กลุ่มควบคุมเท่ากับ 1 ผลการทดลองพบว่า staurosporin ยับยั้งการกระตุ้น p-JNK ในขณะที่ SB225002 ยับยั้งการกระตุ้น p-p38

ตอนที่ 2 ผลของ SPARC ต่อเซลล์โพรงฟัน

การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของเมทริกซ์นอกเซลล์ สามารถสะท้อนถึงระดับการดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์ได้เช่นกัน เช่น การปรากฏขึ้นของลามินิน (laminin) จะมีอิทธิพลต่อการดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์บุผิว (Hay, 1991) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงระดับของไฟโบรเนคติน (fibronectin) จะมีอิทธิพลต่อการดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์กระดูก (Moursi et al., 1996) เป็นต้น

โปรตีนในเมทริกซ์นอกเซลล์ตัวหนึ่งที่มีรายงานว่า น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมและการดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์โพรงฟัน คือ Osteonectin/SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) ซึ่งเป็น glycoprotein ที่สามารถจับกับแคลเซียมไอออน โปรตีนตัวนี้พบได้ทั้งในเนื้อเยื่อยึดต่อและในเนื้อเยื่ออินทรีย์ คือกระดูกและฟัน แต่ระดับของ SPARC ในเนื้อเยื่ออินทรีย์โดยเฉพาะกระดูก จะสูงกว่าในเนื้อเยื่อยึดต่อถึง 50 เท่า (Termine et al., 1981; Kasugai et al., 1991; Maillard et al., 1992; Yao et al., 1994) ในเนื้อฟันและเนื้อเยื่อโพรงฟัน มีรายงานว่าพบการแสดงออกของ SPARC ในเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Begue-Kirn et al., 1994; Takano-Yamamoto et al., 1994) และจะพบโปรตีน SPARC ได้ที่บริเวณเซลล์สร้างเนื้อฟัน เนื้อฟันส่วน predentin และที่บริเวณผนังของ dentinal tubule (Reichert et al., 1992; Tung et al., 1985)

หน้าที่ของ SPARC ในกระดูกและฟัน โดยทั่วไป ยังไม่มีความชัดเจน มีเพียงข้อสันนิษฐานว่า SPARC น่าจะเกี่ยวข้องกับการปรับเปลี่ยนเมทริกซ์ของเนื้อฟันก่อนเกิดการตกตะกอนอินทรีย์ ข้อสมมติฐานถึงบทบาทของ SPARC นี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ที่พบว่าเซลล์โพรงฟันจะตอบสนองต่อ TGF- β โดยการเพิ่มการสร้าง SPARC และการเพิ่มขึ้นนี้จะเกิดขึ้นก่อนการเกิดตะกอนอินทรีย์ (Shiba et al., 1998) แต่จากรายงานเมื่อเร็วๆ นี้ โดย Itota และคณะ (2001) ที่แสดงว่า ระดับของ SPARC ในเนื้อเยื่อโพรงฟันจะสูงขึ้นอย่างมากในระหว่างกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟันหลังได้รับอันตราย ดังนั้น จึงมีข้อสันนิษฐานว่าการเพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดนี้ อาจจะใช้เป็นเครื่องหมายบอกสภาวะการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อ รวมทั้งระดับการดิฟเฟอเรนเชียลของเซลล์โพรงฟันได้

ส่วนหน้าที่โดยทั่วไปของ SPARC นั้น มีรายงานไว้หลายประการด้วยกัน ตั้งแต่การควบคุมการเกาะของเซลล์กับเมทริกซ์นอกเซลล์ การควบคุมการเจริญของหลอดเลือด และการกระตุ้นการสร้างโปรตีนหลายชนิด รวมทั้งการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ I (Lane and Sage 1994; Rosenblatt et al., 1997; Francki et al., 1999) นอกจากนี้ SPARC ยังสามารถกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ในกลุ่มของ matrix metalloproteinases (MMP) ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำลายและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อยึดต่อด้วย (Tremble et al., 1993)

นอกจากนี้ ยังพบว่า การเพิ่มระดับของ SPARC มักพบในเนื้อเยื่อที่กำลังมีการปรับเปลี่ยน หรือมีการซ่อมแซม (Reed and Sage 1996)

ในกรณีของเซลล์มะเร็ง มีรายงานว่า SPARC สามารถเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Kato et al., 1998-99; Rempel et al., 2001; De et al., 2003) รวมทั้งพบว่า กลไกการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง จะเกิดผ่านอินทิกรินในกลุ่มของ α_v ซึ่งเป็นอินทิกรินที่พบมากในเซลล์มะเร็ง (De et al., 2003) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงหน้าที่ของ SPARC กับกระบวนการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์โพรงฟัน

จากรายงานถึงบทบาทของ SPARC ดังกล่าวข้างต้น จึงมีข้อสมมติฐานว่า SPARC น่าจะมีบทบาทในการกระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อหลายชนิด แต่ในกรณีของเนื้อเยื่อโพรงฟัน คงมีเพียงรายงานของ Itota และคณะ (2001) ที่แสดงความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของ SPARC ในเนื้อเยื่อโพรงฟันที่ได้รับอันตราย แต่ยังไม่มียานงานที่ศึกษาหน้าที่ของ SPARC อย่างชัดเจน

การแสดงออกของ SPARC ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนและโกรทแฟคเตอร์ในเซลล์หลายชนิด (Begue-Kirn et al., 1994) แต่ในเนื้อเยื่อโพรงฟัน ผลของโกรทแฟคเตอร์ต่อการแสดงออกของ SPARC ยังคงไม่ชัดเจนนัก โดยมีเพียงรายงานของ Shiba และคณะ (1998) และรายงานของคณะผู้วิจัยเอง (Pavasant et al., 2003) ที่พบว่า TGF- β สามารถกระตุ้น SPARC ในเซลล์โพรงฟัน นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่า ผลของ TGF- β ต่อการแสดงออกของ SPARC จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมี $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ร่วมกระตุ้นด้วย และเนื่องจาก $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ เป็นฮอร์โมนที่มีอิทธิพลต่อการสร้างเนื้อฟันและกระดูก ดังนั้น ความสามารถของ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ในการเสริมผลของ TGF- β ต่อการสร้าง SPARC ยิ่งเพิ่มน้ำหนักให้แก่ความสำคัญของ SPARC ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน และการดีฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟัน นอกจากนี้ รายงานของ Francki และคณะ (1999) ที่ศึกษาใน mesangial cells พบว่า SPARC สามารถควบคุมการแสดงออกของ TGF- β ได้ด้วย ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างสารทั้งสองนี้ ที่อาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อโพรงฟัน

ผลการทดลอง

ก. ผลของ SPARC ต่อการเจริญของเซลล์โพรงฟัน

เนื่องจากมีรายงานที่แสดงว่า SPARC เป็นโปรตีนที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์ เช่นในเซลล์ endothelial และ smooth muscle cells เป็นต้น (ดู review ใน Yan and Sage 1999; Brekken and Sage 2000) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเริ่มการทดสอบด้วยการศึกษาถึงผลของ SPARC ต่ออัตราการเจริญของเซลล์ โดย

การกระตุ้นเซลล์ด้วย SPARC ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 0, 1, 3, และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปนเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay ซึ่งเป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ ในไมโทคอนเดรีย ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 8 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ แสดงว่า SPARC ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์โพรงฟัน

ข. ผลของ SPARC ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์

ในการทดสอบผลของ SPARC ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ คณะผู้วิจัยเลือกใช้ 48-well chemotaxis apparatus ซึ่งมีหลักการคือ เซลล์จะถูกหว่านลงในตอนบนของ apparatus ซึ่งแยกจากตอนล่างด้วยแผ่นกั้นที่มีรูพรุนขนาด 8 ไมโครเมตร จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารที่ต้องการทดสอบไว้ในส่วนล่างจนเต็ม อาหารเลี้ยงเซลล์ในส่วนล่างจะซึมผ่านรูไปสัมผัสกับเซลล์ในส่วนบน ซึ่งหากสารในส่วนล่างสามารถดึงดูดการเคลื่อนที่ของเซลล์ (chemotactic) เซลล์ก็จะเคลื่อนผ่านรูมายังส่วนล่างมากกว่าในสถานะที่ไม่มีสารดึงดูด และการประเมินค่าจะทำโดยการย้อมสีเซลล์ที่อยู่ในส่วนล่าง และนับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

รูปที่ 9 แสดงผลของ SPARC ในการดึงดูดการเคลื่อนที่ของเซลล์โพรงฟัน โดยจะเห็นการเคลื่อนที่ของเซลล์โพรงฟันเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ SPARC ที่ใช้

ผลการทดลองในรูปที่ 10 และ 11 เป็นการใช้ตัวยับยั้ง เพื่อศึกษากลไกการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของ SPARC ผลการทดลองแสดงว่า SPARC เหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านทาง ERK และน่าจะเกี่ยวข้องกับ $\alpha V\beta 3$ integrin

นอกจากนี้ การที่ suramin ให้ผลในการยับยั้ง แสดงว่า น่าจะเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์โพรงฟันโดย SPARC ยังคงไม่ชัดเจน

ในรูปที่ 12 แสดงผลของ SPARC ในการกระตุ้นให้เกิด active ERK ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ตัวยับยั้ง ERK สามารถยับยั้งผลของ SPARC ในรูปที่ 10 นอกจากนี้ neutralizing antibody ต่อ $\alpha V\beta 3$ integrin และ suramin ก็สามารถยับยั้งการเกิด active ERK หลังการกระตุ้นด้วย SPARC เช่นกัน สนับสนุนว่า SPARC น่าจะส่งสัญญาณผ่าน $\alpha V\beta 3$ integrin และ/หรือ G-protein receptor ก่อนจะส่งผ่านสัญญาณไปยัง ERK

บทวิจารณ์

ผลการทดลองนี้ สนับสนุนว่า SPARC น่าจะทำหน้าที่เป็น chemotactic factor สำหรับเซลล์โพรงฟัน ซึ่งความสามารถนี้ มีรายงานใน Prostate cancer cell line (De et al., 2003) ซึ่งความสามารถในการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์นี้ สนับสนุนว่า SPARC อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน

ในสภาวะที่ฟันได้รับอันตราย มีรายงานว่าระดับของ SPARC เพิ่มขึ้นรอบเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Itota et al., 2001) นอกจากนี้ ระดับของ TGF- β ก็เพิ่มขึ้น (ดูข้างต้น) และมีรายงานว่า TGF- β สามารถเพิ่มการสร้าง SPARC ในเซลล์โพรงฟันได้ (Pavasant et al., 2003)

มีรายงานที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างอินทิกรินกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Huttenlocher et al., 1996; Palecek et al., 1997) ซึ่งสอดคล้องกับผลของ neutralizing antibody ต่อ $\alpha V\beta 3$ integrin ที่ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์โพรงฟัน และเมื่อประกอบกับผลที่แสดงว่า neutralizing antibody ต่อ $\alpha V\beta 3$ integrin สามารถยับยั้งการเกิด active ERK จากกการกระตุ้นของ SPARC ทำให้เกิดเป็นข้อสมมติฐานว่า SPARC อาจส่งสัญญาณผ่านมาทางอินทิกรินชนิดนี้

ค. ผลของ SPARC ต่อการสร้างไฟโบรเนคติน

โปรตีนไฟโบรเนคตินเป็นโปรตีนที่ ช่วยกระตุ้นการแบ่งตัว การยึดเกาะและการเคลื่อนที่ของเซลล์ จึงเป็นโปรตีนที่ยอมรับกันว่า สัมพันธ์กับการหายของบาดแผล

ตามที่แสดงผลไว้ในตอนต้นว่า TGF- β สามารถเพิ่มการสร้างไฟโบรเนคตินจากเซลล์โพรงฟันได้ และในการทดสอบผลของ SPARC พบว่าสามารถเพิ่มการสร้างโปรตีนไฟโบรเนคตินได้เช่นกัน ดังแสดงผลในรูปที่ 13 โดยการตรึงสอทั้งด้วยวิธี Western analysis และวิธี immunocytochemistry และการกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนคตินจะแปรผันตามความเข้มข้นของ SPARC ที่ใช้กระตุ้น

อย่างไรก็ดี พบว่า ระดับของ mRNA ไม่มีการเปลี่ยนแปลง คงเปลี่ยนแปลงเฉพาะระดับของโปรตีน แสดงว่าผลของ SPARC ต่อไฟโบรเนคติน น่าจะเกิดในกลไกระดับ post-transcriptional regulation

เมื่อตรวจสอบเพิ่มเติมโดยใช้ actinomycin D ซึ่งยับยั้งการสร้าง mRNA และ cycloheximide ซึ่งยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีน พบว่าในสภาวะที่เติม cycloheximide ไม่พบการสร้างโปรตีนไฟโบรเนคตินเลย ในขณะที่การใช้ actinomycin D ยังพบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนไฟโบรเนคติน ซึ่งสอดคล้องกับแนวคิดที่ว่าผลของ SPARC ต่อการสร้างไฟโบรเนคตินเป็นแบบ post-transcriptional regulation (รูปที่ 13)

ผลการทดลองในรูปที่ 14 แสดงให้เห็นว่า ผลของ SPARC ในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนไฟโบรเนคติน ถูกยับยั้งได้ด้วยตัวยับยั้งต่อ AKT และ rapamycin (สารยับยั้งการทำงานของ mTOR หรือ mammalian target

of rapamycin ซึ่งเป็นเอนไซม์ kinase ตัวหนึ่งที่ควบคุมกระบวนการ translation) แสดงว่ากระบวนการกระตุ้นน่าจะเกิดจาก SPARC ผ่านไปทาง AKT/mTOR

ในการทดลองถัดมา เมื่อใช้ neutralizing antibody ต่อ $\alpha V\beta 3$ integrin และ ตัวยับยั้งต่อ ERK พบว่าตัวยับยั้งทั้งสองสามารถยับยั้งผลของ SPARC ต่อการสร้างไฟโบรเนคตินได้ (รูปที่ 15) เช่นเดียวกับที่ยับยั้งผลของ SPARC ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่กล่าวถึงแล้วข้างต้น และสนับสนุนว่า SPARC น่าจะส่งสัญญาณผ่าน $\alpha V\beta 3$ integrin

เพื่อตรวจสอบแนวคิดนี้ คณะผู้วิจัยจึงทดลองทำ co-immunoprecipitation โดยการ precipitate αV integrin และย้อมหา SPARC โดยการทดลองเริ่มจากการกระตุ้นเซลล์ให้สร้าง SPARC ด้วย TGF- β เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจึงทำการละลายเซลล์และ precipitate ด้วย anti- αV integrin และนำมาแยกด้วยไฟฟ้าเพื่อย้อมดู SPARC ด้วยเทคนิค Western analysis ผลการทดลองในรูปที่ 15 แสดงว่าการ precipitate αV integrin สามารถดึง SPARC ออกมาด้วยได้ แสดงว่าน่าจะมีการจับกันระหว่าง αV integrin และ SPARC และสนับสนุนแนวคิดที่ว่า SPARC ส่งสัญญาณผ่านเข้าสู่เซลล์โพรงฟันทาง $\alpha V\beta 3$ integrin

บทวิจารณ์

ความสามารถในการกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนคติน สนับสนุนบทบาทของ SPARC ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ โดยมีรายงานที่แสดงว่าการเพิ่มขึ้นของ SPARC สัมพันธ์กับการหายของเนื้อเยื่อโพรงฟัน (Piva et al., 2006) โดยพบการสะสมของไฟโบรเนคตินในเนื้อเยื่อโพรงฟันตำแหน่งที่ปิดแผลทะลุด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ นอกจากนี้ ยังพบมีการสะสมของไฟโบรเนคตินใน basement membrane ในระหว่างการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์สร้างเนื้อฟัน (Lesot et al., 1981) ซึ่งแสดงถึงบทบาทของไฟโบรเนคตินในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟันและดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์โพรงฟัน

งานวิจัยครั้งนี้ ยังแสดงให้เห็นว่า SPARC น่าจะจับกับ $\alpha V\beta 3$ integrin ได้โดยตรง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานโดย De และคณะ ซึ่งเสนอว่า SPARC เหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากผ่าน $\alpha V\beta 3$ integrin เช่นกัน

งานวิจัยยังพบความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจาก SPARC ที่ผ่านมาทาง $\alpha V\beta 3$ integrin และส่งต่อไปยัง ERK และ AKT ในการสร้างไฟโบรเนคตินด้วย

ง. ผลของ SPARC ต่อการสร้างอินทิกริน

การที่ SPARC มีผลต่อการสร้างโปรตีนไฟโบรเนคติน เกิดเป็นคำถามว่า SPARC จะมีผลต่อการแสดงออกของอินทิกรินด้วยหรือไม่ ผลการทดลองในรูปที่ 16 แสดงว่า SPARC เพิ่มปริมาณของโปรตีน $\beta 1$ integrin แต่ไม่มีผลต่อ $\alpha 5$ integrin และทำให้ปริมาณของ $\alpha 5 \beta 1$ integrin เพิ่มขึ้น

การเพิ่มขึ้นของโปรตีน สอดคล้องกับระดับของ mRNA ที่เพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าระดับของ mRNA ของ $\beta 1$ เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ GAPDH แต่ระดับของ $\alpha 5$ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

เพื่อพิสูจน์ว่า การเพิ่มขึ้นของไฟโบรเนคติน สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ $\beta 1$ integrin หรือไม่ เซลล์โพรงฟันถูกกระตุ้นด้วย SPARC ในสภาวะที่มีหรือไม่มี neutralizing antibody ต่อ $\beta 1$ integrin และพบว่า การเติม neutralizing antibody ต่อ $\beta 1$ integrin ไม่มีผลต่อการเพิ่มของไฟโบรเนคติน (รูปที่ 16)

ผลการทดลองในรูปที่ 17 พบว่า neutralizing antibody ต่อ $\alpha V \beta 3$ integrin สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ $\beta 1$ integrin ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วยตัวยับยั้งต่อ ERK หากแต่ยับยั้งได้ด้วยตัวยับยั้งต่อ JNK ซึ่งผลการทดลองแสดงว่า ผลของ SPARC ต่อการเพิ่มขึ้นของ $\beta 1$ integrin อาจเกิดผ่าน $\alpha V \beta 3$ integrin เช่นเดียวกับผลต่อการเคลื่อนที่ และต่อไฟโบรเนคติน แต่ไม่ได้ผ่าน ERK เช่นเดียวกัผลต่อการเคลื่อนที่และการสร้างไฟโบรเนคติน แต่เกิดผ่าน JNK

สรุป

ผลการทดลองทั้งหมดนี้ แสดงขึ้นความเป็นไปได้ที่ทั้ง TGF- β และ SPARC สามารถเหนี่ยวนำการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน ผลการทดลองที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย พบว่า TGF- β สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์โพรงฟันสร้าง SPARC และในการทดลองครั้งนี้ ก็พบเพิ่มเติมว่า TGF- β เหนี่ยวนำการเพิ่มขึ้นของ NGF รวมทั้งสามารถกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนคติน และคอลลาเจนในเซลล์โพรงฟันด้วย

การเพิ่มของ NGF แม้จะยังไม่สามารถพิสูจน์ความสัมพันธ์กับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อได้ แต่ก็เป็นหนึ่งในกลไกการป้องกันตนเอง โดย NGF จะทำให้เกิด hypersensitivity ของฟัน และจากรายงานว่าสามารถกระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อบางชนิด ผลของ NGF ต่อเซลล์โพรงฟัน จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ส่วนผลของ SPARC ต่อเซลล์โพรงฟัน ค่อนข้างชัดเจนว่าน่าจะกระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน เพราะ SPARC กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ รวมทั้งกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนคตินซึ่งเป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ

นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบว่า SPARC น่าจะส่งสัญญาณผ่าน $\alpha V\beta 3$ integrin โดย $\alpha V\beta 3$ integrin อาจทำหน้าที่เป็น SPARC receptor ในเซลล์โพรงฟัน และโดยที่ SPARC receptor ยังไม่มีรายงานที่ชัดเจน ผลการทดลองครั้งนี้ จึงเป็นการเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับประเด็นนี้

นอกจากนี้ SPARC ยังอาจส่งสัญญาณผ่าน G-protein coupled receptor ด้วย จากผลการใช้ suramin และ SB225002 อย่างไรก็ดี ยังต้องมีการทดลองเพิ่มเติมต่อไป

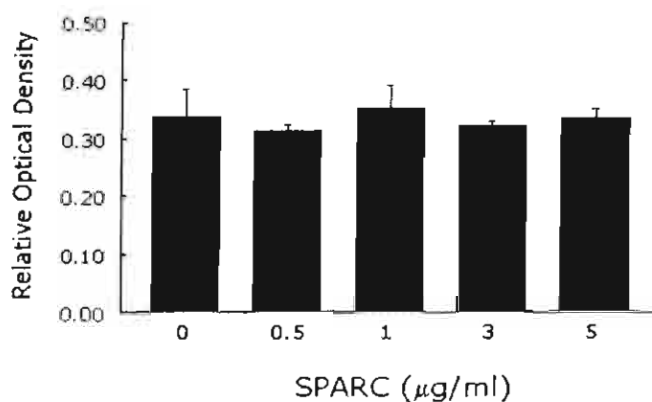


Figure 8

รูปที่ 8 กราฟแสดงผลของ SPARC ที่มีต่อการเจริญของเซลล์โพรงฟัน

เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย SPARC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีซีรัม จากนั้นจึงวัดปริมาณเซลล์ด้วย เทคนิค MTT ผลการทดลองแสดงว่า SPARC ที่ความเข้มข้น 1-5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์

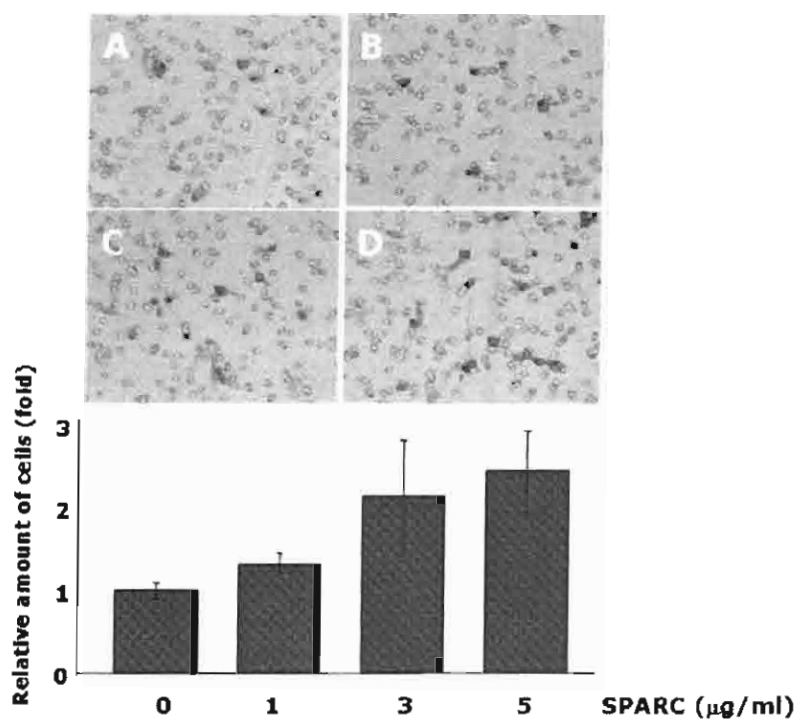


Figure 9

รูปที่ 9 SPARC กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์โพรงฟัน

ภาพบนแสดงเซลล์บนแผ่น membrane ซึ่งเป็นเซลล์ที่เคลื่อนผ่านมาจาก upper chamber ของ chemotatic apparatus และย้อมด้วย hematoxylin จากนั้นจึงนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และมาตัวเลขมาแสดงเป็นกราฟด้านล่าง โดยให้จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม เท่ากับ 1 ผลการทดลอง แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำสาม โดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วย 3 ราย

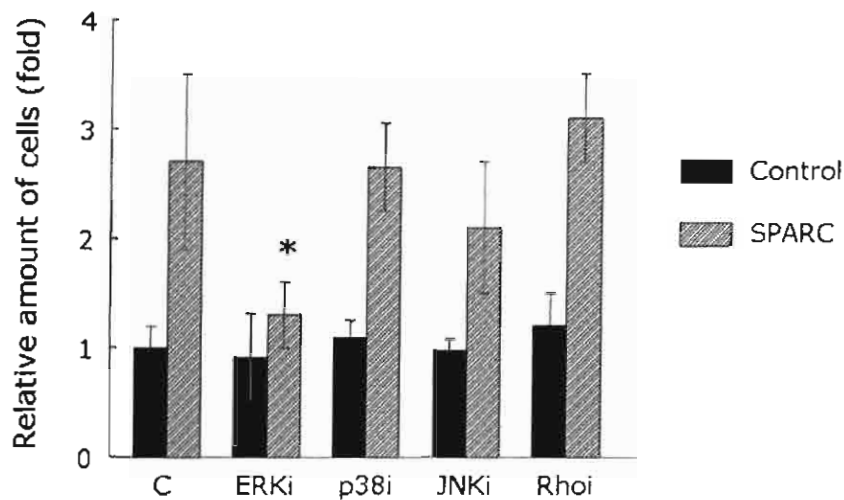


Figure 10

รูปที่ 10 การเคลื่อนที่ของเซลล์โพรงฟันถูกยับยั้งด้วย ERK inhibitor

กราฟแสดงจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่าน membrane ในสภาวะที่มี หรือ ไม่มีตัวยับยั้งของ MAPK 3 ชนิด คือ ERK inhibitor, JNK inhibitor และ p38 inhibitor รวมทั้ง Rho inhibitor ซึ่งเป็นตัวส่งผ่านสัญญาณที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ของเซลล์ ผลการทดลองแสดงว่า ERK inhibitor เป็นตัวยับยั้งเพียงตัวเดียวที่สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

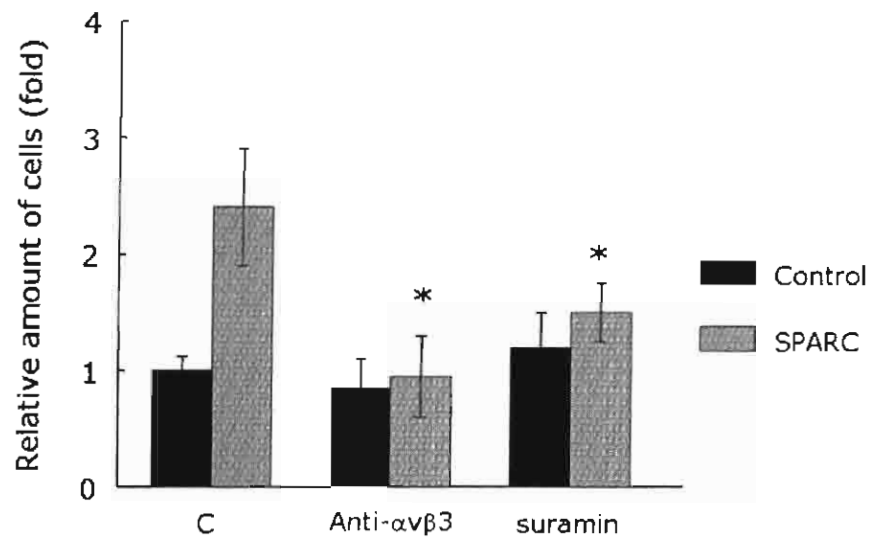


Figure 11

รูปที่ 11 การเคลื่อนที่ของเซลล์โพรงฟันถูกยับยั้งด้วย $\alpha v \beta 3$ integrin antibody และ suramin

กราฟแสดงจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนผ่าน membrane ในสถานะที่มี หรือ ไม่มีตัวยับยั้ง 2 ชนิด คือ neutralizing antibody ต่อ $\alpha v \beta 3$ integrin และ suramin (G-protein coupled receptor inhibitor) ผลการทดลองแสดงว่า ตัวยับยั้งทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ

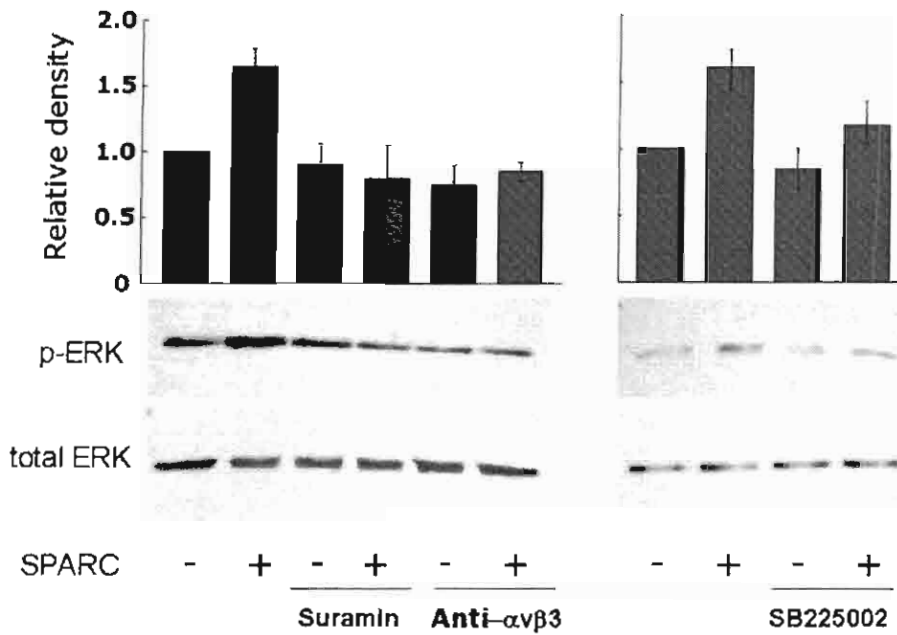


Figure 12

รูปที่ 12 SPARC กระตุ้น p-ERK และยับยั้งด้วย $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin antibody และ suramin

ภาพด้านล่างเป็น Western analysis แสดงว่า SPARC สามารถ activate ERK ได้ (โดยจะพบการเพิ่มขึ้นของ phosphor-ERK เทียบกับ total ERK) โดยกราฟตอนบนเป็นค่าความเข้มที่อ่านได้จากรูป โดยอ่านเป็นค่า p-ERK ต่อ total ERK ซึ่งผลที่ได้แสดงว่า ทั้ง suramin และ neutralizing antibody ต่อ $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin สามารถยับยั้งผลของ SPARC ในการ activate ERK

ภาพทางขวาแสดงผลของ SB225002 ซึ่งเป็น G-protein coupled receptor inhibitor และพบว่าสามารถยับยั้งผลของ SPARC ในการ activate ERK ได้บางส่วน

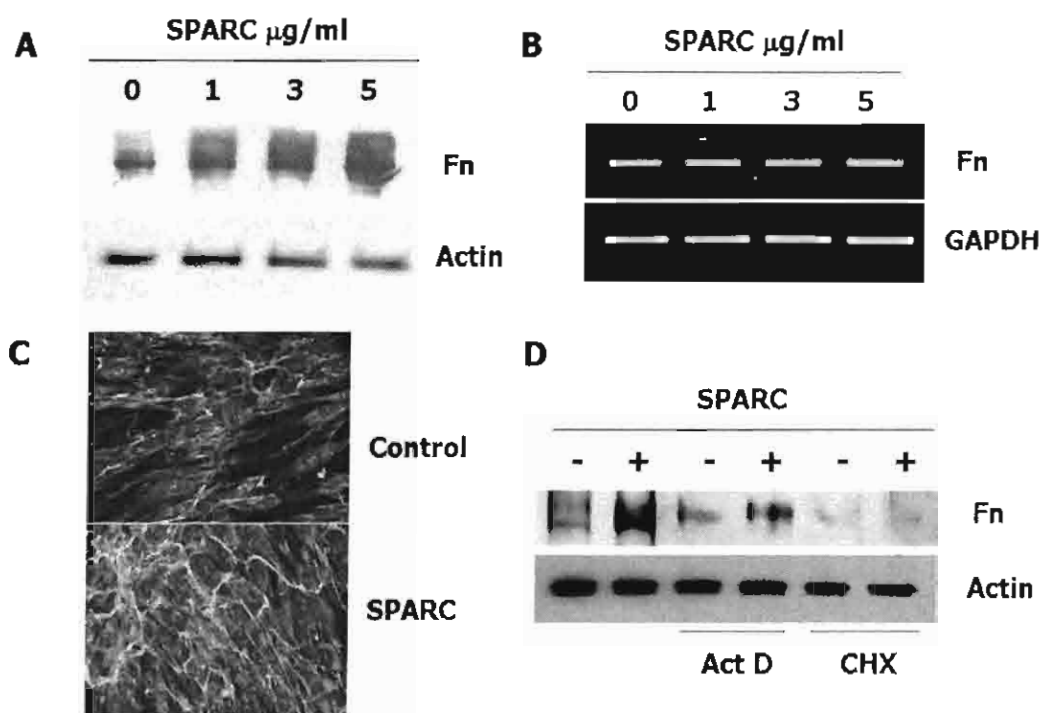


Figure 13

รูปที่ 13 SPARC กระตุ้นการสร้างโปรตีนไฟโบรเนคติน

เซลล์โพรงฟันถูกกระตุ้นด้วย SPARC ที่ความเข้มข้น 1-5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงตรวจสอบการแสดงออกของไฟโบรเนคตินด้วยวิธี Western analysis (A) และ RT-PCR (B) ผลการตรวจสอบพบว่า ระดับของไฟโบรเนคตินเพิ่มสูงขึ้น แต่ระดับ mRNA ไม่เปลี่ยนแปลง ในรูป C แสดงผลการกระตุ้นเซลล์ด้วย SPARC ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งพบการสะสมของไฟโบรเนคตินในเมทริกซ์รอบเซลล์เพิ่มมากขึ้น

ในรูป D แสดงผลการกระตุ้นเซลล์ด้วย SPARC ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสภาวะที่มี หรือ ไม่มี Actinomycin D (inhibit transcription) และ cyclohexamide (inhibit translation) ผลการตรวจสอบพบว่า cyclohexamide สามารถยับยั้งการกระตุ้นไฟโบรเนคตินได้ แต่ในสภาวะที่มี actinomycin D ยังคงพบการเพิ่มการสร้างไฟโบรเนคติน

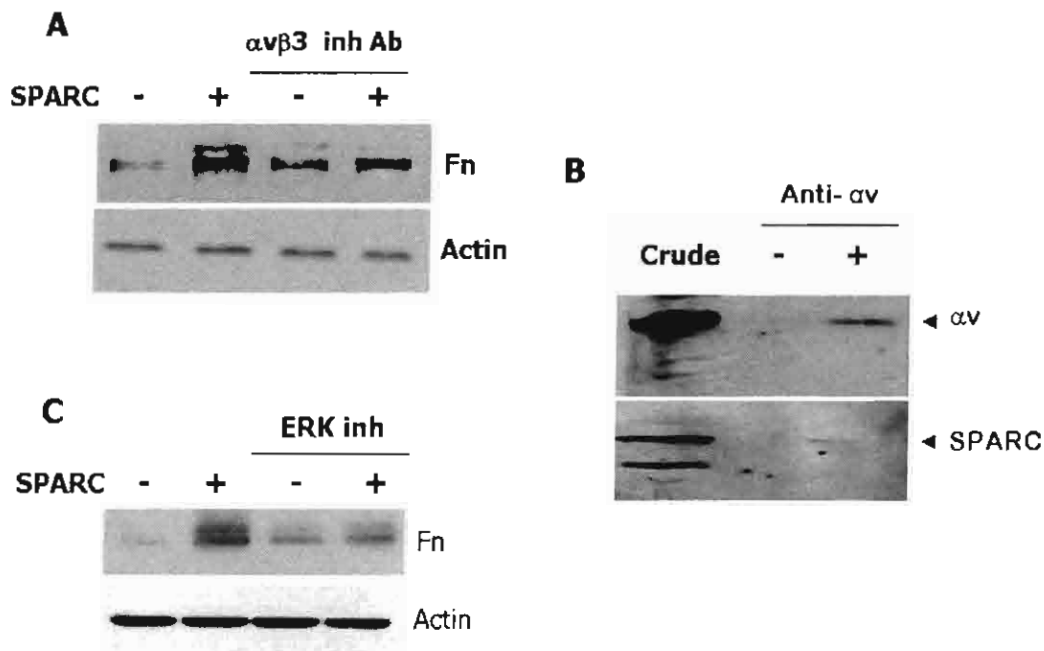


Figure 14

รูปที่ 14 SPARC กระตุ้นการสร้างไฟโบรเนคติน ผ่านทาง $\alpha v \beta 3$ integrin และ ERK pathway

รูป (A) และ (C) แสดงผลการกระตุ้นของ SPARC ในการเพิ่มการสร้างไฟโบรเนคติน และผลการกระตุ้นนี้ ยับยั้งได้ด้วย neutralizing antibody ต่อ $\alpha v \beta 3$ integrin (A) และ ERK inhibitor (C).

เมื่อทำ immunoprecipitation ด้วย αv integrin antibody จากนั้นจึงนำ lysate ที่ได้มาตรวจสอบ พบว่า นอกจากจะได้ αv integrin แล้ว ยังได้ SPARC มาด้วย แสดงว่า น่าจะมี direct associated ระหว่าง SPARC กับ αv integrin

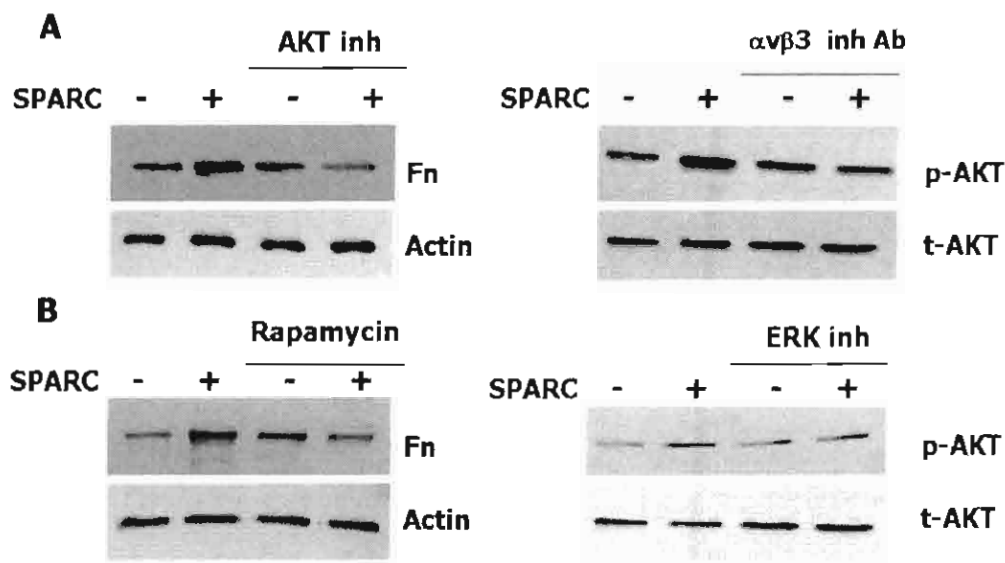


Figure 15

รูปที่ 15 SPARC กระตุ้นการทำงานของ AKT/mTOR pathway

ผลการกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนคตินในเซลล์โพรงฟันด้วย SPARC พบว่าสามารถยับยั้งได้ด้วย AKT inhibitor (A) และ Rapamycin (mTOR inhibitor) (C) แสดงถึงความเกี่ยวข้องของ AKT/mTOR signaling pathway ในกระบวนการเหนี่ยวนำการสร้างไฟโบรเนคติน

รูป (B) และ (D) แสดงระดับของ p-AKT ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย SPARC สนับสนุนความเกี่ยวข้องของ AKT pathway และการกระตุ้น p-AKT นี้ ถูกยับยั้งด้วย neutralizing antibody ต่อ αvβ3 integrin และ ERK inhibitor แสดงว่าการที่ SPARC กระตุ้น AKT น่าจะเกิดผ่าน αvβ3 integrin และ ERK pathway

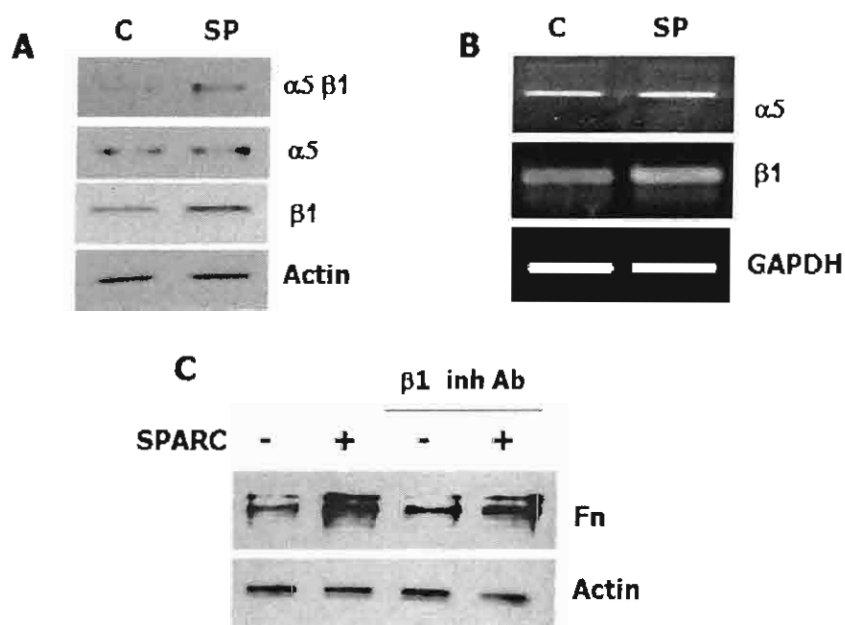


Figure 16

รูปที่ 16 SPARC กระตุ้นการสร้าง $\alpha 5 \beta 1$ integrin

(A) แสดงผลของ SPARC ในการกระตุ้นโปรตีน $\alpha 5 \beta 1$ integrin โดยเมื่อแยกการตรวจสอบพบว่า C กระตุ้น $\beta 1$ integrin แต่ไม่มีผลต่อ $\alpha 5$ integrin (B) ผลการตรวจสอบระดับ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าระดับของ $\beta 1$ integrin เพิ่มขึ้นแต่ระดับ $\alpha 5$ integrin ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

(C) เมื่อทดสอบว่าการเพิ่มของ $\beta 1$ integrin สัมพันธ์กับการเพิ่มของไฟโบรเนคตินหรือไม่ พบว่า การใช้ neutralizing antibody ต่อ $\beta 1$ integrin ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของไฟโบรเนคตินเมื่อกระตุ้นด้วย SPARC

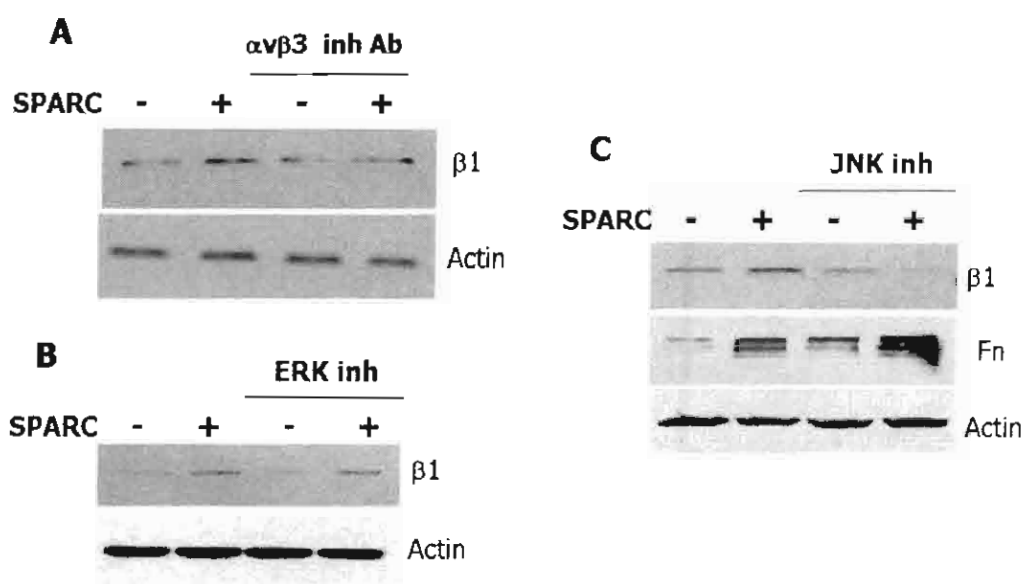


Figure 17

รูปที่ 17 SPARC กระตุ้นการสร้าง $\beta 1$ integrin ผ่าน JNK

(A) แสดงผลของ SPARC ในการกระตุ้นการสร้าง $\beta 1$ integrin เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Western analysis พบว่าสัญญาณการกระตุ้นของ SPARC ผ่าน $\alpha v \beta 3$ integrin

(B) และ (C) เป็นการตรวจสอบว่าสัญญาณของ SPARC ในการกระตุ้น $\beta 1$ integrin เกิดผ่าน ERK เช่นเดียวกับการกระตุ้นการสร้างไฟโบรเนคติน หรือไม่ ผลการทดลองพบว่า สัญญาณการกระตุ้น $\beta 1$ integrin ไม่เกิดผ่าน ERK แต่เกิดผ่าน JNK โดยที่ JNK ไม่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นไฟโบรเนคติน

เอกสารอ้างอิง

- Basu A, Kligman LH, Samulewicz SJ, Howe CC . Impaired wound healing in mice deficient in matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC Cell Biol* 2001;2:15.
- Begue-Kirn C, Smith AJ, Ruth JV, et al., Effects of dentine proteins, transforming growth factor β 1 and bone morphogenic protein 2 on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 1992;36:491-503.
- Berryhill BL, Kane B, Stramer BM, Fini ME, Hassell JR . Increased SPARC accumulation during corneal repair. *Exp Eye Res* 2003;77:85-92.
- Bradshaw AD, Sage EH . SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 2001;107:1049-1054.
- Bradshaw AD, Reed MJ, Sage EH. SPARC-null mice exhibit accelerated cutaneous wound closure. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1-10
- Bradshaw AD, Puolakkainen P, Dasgupta J, Davidson JM, Wight TN, Helene Sage E. SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *J Invest Dermatol* 2003;120:949-955.
- Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* 2001;19:816-827.
- Byers MR, Wheeler EF, Bothwell M. Altered expression of NGF and p75 NGF-receptor mRNA by fibroblasts of injured teeth precedes sensory nerve sprouting. *Growth Factors* 1992;6:41-52.
- Byers MR, Schattelman GC, Bothwell M. Multiple functions for NGF receptor in developing, aging and injured rat teeth are suggested by epithelial, mesenchymal, and neural immunoreactivity. *Development* 1990;109:461-471.
- Cantrella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappala G, Pafumi C, Bernardini R. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J* 2002;16:1307-1309.
- Chen HC. Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol* 2005;294:15-22.
- Chung WC, Kermode JC. Suramin disrupts receptor-G protein coupling by blocking association of G protein α and $\beta\gamma$ subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:191-198.
- Coffey RJ Jr, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells. *J Cell Physiol* 1987;132:143-148.
- Delany AM, Kalajzic I, Bradshaw AD, Sage EH, Canalis E. Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology* 2003;144: 2588-2596.

- De S, Chen J, Narizhneva NV, Heston W, Brainard J, Sage EH, et al.. Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J Biol Chem* 2003;278:39044-50.
- D'Souza RN, Happonen RP, Ritter NM, Butler WT. Temporal and spatial patterns of transforming growth factor- β 1 expression in developing rat molars. *Arch Oral Biol* 1990;35:957-965.
- Eliceiri BP, Klemke R, Strömblad S, Cheresh D. Integrin α β 3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol* 1998;140: 1255-1263.
- Francki A, McClure TD, Brekken RA, Motamed K, Murri C, Wang T, et al. SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem* 2004;91:915-25.
- Huttenlocher A, Ginsberg MH, Horwitz AF. Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol* 1996;134:1551-1562.
- Inage T, Toda Y. Gene expression of TGF- β 1 and elaboration of extracellular matrix using in situ hybridization and EM radioautography during dentinogenesis. *Anat Rec* 1996;245:250-266.
- Itota T, Nishitani Y, Sogawa N, Sogawa C, Konishi N, Torii Y. Alteration of odontoblast osteonectin expression following dental cavity preparation. *Arch Oral Biol* 2001;46:829-834.
- Kim HP, Lee MS, Yu J, Park JA, Jong HS, Kim TY, Lee JW, Bang YJ. TGF-beta1 (transforming growth factor-beta1)-mediated adhesion of gastric carcinoma cells involves a decrease in Ras/ERKs (extracellular-signal-regulated kinases) cascade activity dependent on c-Src activity. *Biochem J* 2004;379:141-150.
- Kopp R, Pfeiffer A. Suramin alters phosphoinositide synthesis and inhibits growth factor receptor binding in HT-29 cells. *Cancer Res* 1990;50:6490-6496.
- Lambiase A, Manni L, Bonini S, Rama P, Micera A, Aloe L. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1063-1069.
- Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 1994;8:163-173.
- Leonard CM, Fuld HM, Frenz DA, et al., Role of transforming growth factor beta in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF- β and evidence for endogenous TGF- β like activity. *Dev Biol* 1991;145:99-109.
- Lesot H, Osman M, Ruch JV. Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin, and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Dev Biol* 1981;82:371-81.

- Lesot H, Smith AJ, Tziafas D, Bègue-Kirn C, Cassidy N, Ruch JV. Biological active molecules and dental tissue repair: a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation in vitro. *Cell Mater* 1994;4:199-218.
- Lindholm D, Hengerer B, Zafra F, Thoenen H. Transforming growth factor-beta 1 stimulates expression of nerve growth factor in the rat CNS. *Neuroreport* 1990;1:9-12.
- Lindholm D, Castrén E, Kiefer R, Zafra F, Thoenen H. Transforming growth factor β 1 in the rat brain: Increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 1992;117:395-400.
- Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC. Molecular regulation of odontoblast activity under dentine injury. *Adv Dent Res* 2001;15:46-50.
- Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:169-178.
- Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000;19:1745-1754.
- Matsuda H, Koyama H, Sato H, Sawada J, Itakura A, Tanaka A, Matsumoto M, Konno K, Ushio H, Matsuda K. Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. *J Exp Med* 1998;187:297-306.
- Mitsiadis TA, Dicou E, Joffre A, Magloire H. Immunohistochemical localization of nerve growth factor (NGF) and NGF receptor (NGF-R) in the developing first molar tooth of the rat. *Differentiation* 1992;49:47-61.
- Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 1997;385:537-540.
- Pavasant P, Yongchaitrakul T, Pattamapun K, Arksornnukit 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;48:717-722.
- 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 Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:66-71.
- Reichert T, Storkel S, Becker K, Fisher LW. The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study. *Calcif Tiss Int* 1992;50:468-472.
- Roberts MS, Woods AJ, Shaw PE, Norman JC. ERK1 associates with $\alpha_v\beta_3$ integrin and regulates cell spreading on vitronectin. *J Biol Chem* 2003;278:1975-1985.

- Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Felding-Habermann B. Activated integrin $\alpha v \beta 3$ cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9482-9487.
- Ruch JV, Lesot H, Begue CK. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995;39:51-68.
- Salaznyk RM, Klees RF, Hughlock MK, Plopper GE. ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin. *Cell Commun Adhes* 2004;11:137-153.
- Sato O, Maeda T, Kannari K, Iwanaga T, Fujita T. Immunohistochemical demonstration of nerve growth factor receptor in human teeth. *Biomed Res* 1990;11:353-358.
- Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998; 91:2645-2657.
- Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-700.
- Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) and alkaline phosphatase by human pulp cell in culture. *J Cell Physiol* 1998;174:194-205.
- Shiba H, Uchida Y, Kamihagi K, Sakata M, Fujita T, Nakamura S, Takemoto T, Kato Y, Kurihara H. Transforming growth factor- $\beta 1$ and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells. *J Dent Res* 2001;80:1653-1659.
- Smith AJ, Tobias RS, Murray PE. Transdental stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentine matrix components. *J Dent* 2001;29:341-346.
- Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, Nomura S. Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem* 1994;42:885-896.
- Tziafas D, Papadimitriou S. Role of exogenous TGF- β in induction of reparative dentinogenesis in vivo. *Eur J Oral Sci* 1998;106 Suppl 1:192-196.
- Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital therapy. *J Dent* 2000;28:77-92.

- Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S . Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11 beta 1 and alpha 2 beta 1. *J Biol Chem* 2002;277:37377-81.
- Woods A, Couchman JR. Syndecan-4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell* 1994; 5:183-192.
- Wu RX, Laser M, Han H, Varadarajulu J, Schuh K, Hallhuber M, Hu K, Ertl G, Hauck CR, Ritter O. Fibroblast migration after myocardial infarction is regulated by transient SPARC expression. *J Mol Med* 2006;84:241-252.
- Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 1999;17:1860-1870.
- Yan Q, Clark JI, Wight TN, Sage EH. Alterations in the lens capsule contribute to cataractogenesis in SPARC-null mice. *J Cell Sci* 2002;115:2747-2756.

ภาคผนวก 1

บทความสำหรับเผยแพร่

โรคฟันผุเป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญทางทันตสาธารณสุข ผลของการเกิดฟันผุจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อโพรงฟัน (pulp tissue) เช่น การเหนี่ยวนำการอักเสบขึ้นภายในโพรงฟัน ซึ่งเป็นผลให้เกิดอาการเสียวฟัน หรือปวดฟัน ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของเนื้อฟันจะมีลักษณะเป็นท่อเล็กๆ (dental tubule) ทอดตัวจากผิวฟันไปยังโพรงประสาทฟัน ดังนั้น เชื้อโรค หรือผลผลิตของเชื้อโรค จะสามารถผ่านเข้าสู่โพรงประสาทฟันได้ตามท่อเหล่านี้

เซลล์ของเนื้อเยื่อโพรงฟัน (dental pulp cells) หรือที่จะเรียกต่อไปว่า เซลล์โพรงฟัน เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อโพรงฟัน เซลล์โพรงฟันเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด คือมีความสามารถในการแบ่งตัว และสามารถ เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งได้ เซลล์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ทั้งในแง่การตอบสนองต่อการอักเสบ และทำหน้าที่ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยการตอบสนองที่เด่นชัด คือ การพยายามสร้างเนื้อฟันชนิดที่เรียกว่า เนื้อฟันตติยภูมิ (tertiary dentin or reparative dentin) พอกพูนขึ้นที่ผนังของโพรงฟันได้ต่อรอยผุ เพื่อป้องกันอันตรายจากแบคทีเรียที่อยู่ในรอยผุของฟัน โดยการปิดท่อเล็กๆภายในเนื้อฟัน

การที่เซลล์โพรงฟันจะทำหน้าที่สร้างเนื้อฟันตติยภูมิได้ จะต้องมีการเปลี่ยนแปลงสภาพ หรือ ดิฟเฟอเรนซิเอต (differentiate) ไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast-like cells) เพื่อทำหน้าที่ซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน และแม้ว่าเซลล์โพรงฟันจะมีศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงสภาพ แต่ก็มีปัจจัยหลายอย่างเป็นตัวบ่งชี้ความสำเร็จในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน ได้แก่ การติดเชื้อ โดยพบว่าถ้ามีการติดเชื้อในเนื้อเยื่อโพรงฟัน ก็จะไม่สามารถเกิดการซ่อมแซมได้ รวมทั้งการมีสารกระตุ้นที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น growth factors ต่างๆ ที่สามารถช่วยในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ เป็นต้น

โปรตีนที่อยู่รอบๆเซลล์และ growth factor เป็นสองปัจจัยสำคัญ ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแบ่งตัว (proliferation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) และ การดิฟเฟอเรนซิเอตของเซลล์หลายชนิด รวมทั้งเซลล์โพรงฟัน โดย growth factor ตัวหนึ่งที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน คือ Transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1)

TGF- β 1 เป็นโกรทแฟคเตอร์ที่มีบทบาทในการกระตุ้นการซ่อมแซมและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์กระดูก และฟัน ภายในเนื้อฟัน เซลล์สร้างเนื้อฟันจะสร้าง TGF- β จำนวนมากฝังไว้ในเนื้อฟัน ซึ่งเมื่อฟันได้รับอันตราย ก็จะปล่อย TGF- β ออกมาสู่เนื้อเยื่อโพรงฟัน ซึ่งจะช่วยเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนที่ช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ผลการวิจัยครั้งนี้ พบว่าเซลล์โพรงฟันสามารถตอบสนองต่อ TGF- β โดยการเพิ่มการสร้างโปรตีน

อย่างน้อยสองชนิดคือ ไฟโบรเนคติน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ การแบ่งตัว และการยึดเกาะของเซลล์ และ คอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของกระดูกและฟัน

นอกจากนี้ ผลงานวิจัยยังพบกลไกในระดับอณูชีววิทยาว่า TGF- β สามารถเหนี่ยวนำการหลั่ง nerve growth factor ซึ่งเป็น growth factor ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมระบบประสาท ช่วคงความมีชีวิตของเนื้อเยื่อ และทำให้เนื้อเยื่อมีความไวต่อสิ่งเร้ามากขึ้น ทำให้เกิดการเสียฟัน ซึ่งในส่วนหลังนี้เป็นกลไกช่วยในการป้องกันการใช้งานฟันในระยะที่ฟันเพิ่งได้รับอันตราย

คณะผู้วิจัยได้เคยรายงานไว้แล้วว่า TGF- β สามารถทำงานร่วมกับวิตามินดี ในการกระตุ้นการสร้างโปรตีน Osteonectin หรือ SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่พบได้มากในเนื้อฟันและกระดูก และพบมากบริเวณรอบเซลล์สร้างเนื้อฟัน นอกจากนี้ ยังพบว่า การเพิ่มขึ้นของ SPARC ในฟันที่ถูกกรอฟันด้วย ดังนั้น SPARC จึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน

ผลงานวิจัยครั้งนี้ พบว่า SPARC สามารถเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์ กระตุ้นการสร้างไฟโบรเนคติน รวมทั้งกระตุ้นการสร้างอินทิกริน ซึ่งเป็นโปรตีนผิวเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเซลล์กับโปรตีนโดยรอบ รวมทั้งค้นพบกลไกการทำงานของ SPARC ในระดับอณูชีววิทยา

ผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ TGF- β และ SPARC ที่มีต่อเซลล์โพรงฟัน ซึ่งผลดังกล่าวสนับสนุนว่าทั้ง TGF- β และ SPARC น่าจะมีบทบาทในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน ความเข้าใจถึงกลไกการทำงานของ TGF- β และ SPARC จะช่วยให้เราเข้าใจกระบวนการซ่อมแซม รวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์เพื่อพัฒนา ยา หรือวิธีการให้การรักษาทางทันตกรรมให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ภาคผนวก 2

Manuscripts

1. 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.
2. Srisawasdi S, Pavasant P. Different roles of dexamethasone on TGF- β 1-induced fibronectin and nerve growth factor expression in dental pulp cells. J Endod 2007; 33:1057-1060.
3. Pavasant P, Yongchaitrakul T. SPARC induces dental pulp cell migration via α v β 3 integrin and ERK Oral Dis 2007 Accepted doi:10.1111/j.1601-0825.2007.01383.x

Transforming growth factor- β 1 up-regulates the expression of nerve growth factor through mitogen-activated protein kinase signaling pathways in dental pulp cells

Tussanee Yongchaitrakul, Prasit Pavasant

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

Yongchaitrakul T, Pavasant P. Transforming growth factor- β 1 up-regulates the expression of nerve growth factor through mitogen-activated protein kinase signaling pathways in dental pulp cells. *Eur J Oral Sci* 2007; 115: 57–63. © 2007 The Authors. Journal compilation © 2007 Eur J Oral Sci

Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and nerve growth factor (NGF) have been detected in pulp tissues after injury and are implicated in the differentiation of odontoblast-like cells and in pulp tissue repair. We examined TGF- β 1-mediated regulation of NGF and investigated its signaling pathways in human dental pulp cells. Analyses by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) revealed that TGF- β 1 (1 ng ml⁻¹) induced NGF mRNA and protein expression through the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK). Blockade of the p38 MAPK and JNK pathways with the respective upstream inhibitors (SB203580 and SP600125) abolished the TGF- β 1-mediated induction of NGF. In addition, SB225002, a G-protein-coupled receptor antagonist, and staurosporine, a serine-threonine kinase inhibitor, partially inhibited TGF- β 1-mediated induction of NGF. Phospho-p38 MAPK was suppressed by SB225002, whereas phospho-JNK was inhibited by staurosporine. We conclude that TGF- β 1 up-regulates NGF in human dental pulp cells. This suggests that TGF- β 1 plays a role in NGF regulation during pulp tissue repair. The signal of TGF- β 1 involves the activation of MAPK, especially p38 and JNK. We suggest that crosstalk between TGF- β 1 and G-protein-coupled receptor signaling also participates in the inductive mechanism.

Prasit Pavasant, Department of Anatomy,
Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University,
Henri-Dunant Road, Pathumwan, Bangkok
10330, Thailand

Telefax: +66-2-2188870
E-mail: prasit215@gmail.com

Key words: dental pulp cells; MAPK; NGF;
TGF- β 1

Accepted for publication October 2006

Tooth injury can induce reactionary or reparative dentin formation. It has been shown that dental pulp cells, under appropriate conditions, may differentiate into odontoblast-like cells and deposit mineralized tissue (1–3). Several growth factors, such as transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and nerve growth factor (NGF), have been implicated in the differentiation of odontoblast-like cells and in pulp tissue repair (4–6).

TGF- β 1 is a multifunctional cytokine that is significant in the metabolism of several tissues, including dental pulp. TGF- β 1 was shown to be involved in the differentiation of odontoblasts during odontogenesis (2). During early tooth development, TGF- β 1 is believed to be secreted by epithelial cells to induce mesenchymal differentiation. In mature teeth, it is synthesized by odontoblasts and is subsequently trapped in the dentin matrix (7, 8). Upon dentinal and odontoblastic damage, TGF- β 1 is released during tissue demineralization and acts as a stimulating factor for odontoblast-like cell dif-

ferentiation and matrix synthesis (9). Previous studies showed that TGF- β -binding sites were strongly expressed on odontoblasts and pulp cells when TGF- β 1 was present, and up-regulation of reactionary dentin was observed (10). This suggests that the up-regulation of TGF- β 1 is essential for pulp tissue repair.

NGF belongs to the neurotrophin family of proteins, whose activities promote the development, survival, maintenance, and repair of nervous tissues (11). NGF has been detected during tooth development in rats (12, 13) and was shown to be an essential factor in the formation of pulpal sensory innervation (14). Furthermore, the level of NGF is increased in dental pulp tissue after tooth injury (15). Near the site of injury, sensory nerve ending sprouting is preceded by an up-regulation of NGF expression in pulp cells. In addition, NGF is active in the process of tissue repair; it was shown to induce healing of corneal epithelium (16) and to accelerate angiogenesis and nerve formation during cutaneous wound

healing (17, 18). Therefore, an increase of NGF in dental pulp tissue after injury has been generally considered to support nerve survival, induce nerve sprouting, and to provide the important conditions for cell survival, angiogenesis and repair (19, 20).

Although the levels of TGF- β 1 and NGF are found to increase in the pulp tissue after injury, there is no information concerning the influence of TGF- β 1 on the up-regulation of NGF, or vice versa, in dental pulp cells. The only direct evidence, albeit in a different type of tissue, was demonstrated by LINDHOLM *et al.* (21, 22), who showed that TGF- β 1 supported survival of rat glial cells by inducing NGF secretion. However, the mechanism for NGF induction has not been elucidated. The aim of this work was therefore to examine the influence of TGF- β 1 on NGF expression and to investigate the signaling pathways involved.

Material and methods

Cell culture

Human dental pulp (HDP) cells were obtained from caries-free lower third molars, extracted for orthodontic reasons, after obtaining the patients' informed consent. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Dentistry at Chulalongkorn University. The teeth were washed once with 70% ethanol and split longitudinally, using a diamond disk, under water-cooling. The pulp tissues were gently removed by forceps, cut into pieces, and placed in 35 mm culture dishes (Corning, New York, NY, USA). The explants were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 IU ml⁻¹ of penicillin G, 100 IU ml⁻¹ of streptomycin and 0.25 μ g ml⁻¹ of amphotericin B, and incubated in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Each preparation was prepared from one molar. Media and all supplements were from Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA). The cells from passage 3 of three different preparations were used in the experiments.

Treatment of HDP cells

Cells were seeded in six-well plates, at a density of 25,000 cells per cm², and grown to subconfluence. After deprivation of serum for 16 h, the cells were stimulated with recombinant human TGF- β 1 (Calbiochem, EMD Biosciences, La Jolla, CA, USA). To examine the effect of TGF- β 1 on NGF mRNA expression and protein secretion, cells were treated with 0, 0.1, 0.5, or 1 ng ml⁻¹ of TGF- β 1 for 24 h in serum-free medium. The RNA was extracted and the medium collected for analysis. The effective dose was selected and used for the rest of the experiments. Cells were also treated with TGF- β 1 for different time periods (4, 8 and 24 h) to determine the appropriate duration of treatment.

Inhibition

The inhibitors used were SB203580 [p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor], SP600125 [c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor], extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation inhibitor peptide II, SB225002 (a G-protein-coupled receptor inhibitor), and staurosporine (a serine/threonine kinase inhibitor). All inhibitors were

from Calbiochem, EMD Biosciences. Cells were treated with each type of inhibitor for 1 h prior to the addition of 1 ng ml⁻¹ of TGF- β 1. RNA extraction and collection of medium were performed for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analyses, respectively. To examine the signaling molecules affected by TGF- β 1, another set of cultures was treated with 1 ng ml⁻¹ of TGF- β 1 for 30 min and the cell protein extracts were collected for Western blot analysis to detect active/phosphorylated and total MAPK.

RT-PCR

Cells were treated with TGF- β 1, as described above. Total cellular RNA was extracted using Tri reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA), according to the manufacturer's instructions. One microgram of each RNA sample was converted to cDNA by avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) for 1.5 h at 42°C. Subsequently, PCR amplification was performed. The primers were prepared following the reported sequences from GenBank. The oligonucleotide sequences of the primers used are: NGF forward 5'-ATACAGGCGCAACCACACTCAG-3' and NGF reverse 5'-GTCCACAGTAATGTTGCGGGTC-3'; and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) forward 5'-TGAAGGTCTGGAGTCAACGGAT-3' and GAPDH reverse 5'-TCACACCCATGACGAACATGG-3'.

PCR amplification was performed using *Taq* polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) in a reaction volume of 25 μ l containing 25 pmol of primers and 1 μ l of RT product. The amplification profile was one cycle at 94°C for 1 min, 26 cycles at 94°C for 1 min, hybridization at 60°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min for NGF (22 cycles for GAPDH), followed by one extension cycle of 10 min at 72°C. The PCR was performed in the DNA thermal cycler (Biometra, Göttingen, Germany). The amplified DNA was then electrophoresed on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide fluorostaining. All bands were scanned and analyzed using SCION image-analysis software.

ELISA

Measurement of NGF from the media was performed using NGF E_{max} ImmunoAssay Systems (Promega), according to the manufacturer's instructions. All experiments were performed in triplicate.

Western blot analysis

Cells were rinsed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and total cell protein extracts were prepared on ice using modified radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer containing phosphatase inhibitors (1 mM sodium vanadate, 50 mM NaF). Protein concentrations were measured using a BCATM protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein from each sample were boiled and subjected to electrophoresis, under reducing conditions, on a 12% polyacrylamide gel, along with prestained high-molecular-weight standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The proteins were transferred to nitrocellulose (Pierce), using a *trans*-blot cell (Gibco BRL), at 15 V for 90 min. The nitrocellulose was incubated in 5% non-fat milk (Difco, Sparks, MD, USA) for 1 h and then stained with primary antibody overnight at 4°C and with biotinylated secondary antibody followed by peroxidase-labeled streptavidin

(Zymed, South San Francisco, CA, USA). Finally, the nitrocellulose was coated with chemiluminescent reagent (Pierce) and the signal captured with CL-XPosture (Pierce). SCION image analysis software was used to analyze the density of bands.

Primary antibodies, raised against the following proteins, were used: phospho-p38 MAPK (1 : 1,000), phospho-JNK (1 : 1,500), total JNK (1 : 2,500), phospho-ERK1/2 (1 : 1,000), total ERK1/2 (1 : 1,000) (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), and total p38 MAPK (1 : 200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The numbers in parentheses are the dilution ratios of each antibody used in the experiments.

Statistical analysis

All data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). Scheffe's test was used for posthoc analysis ($P < 0.05$).

Results

The results presented in Fig. 1 show that TGF- β 1 increased NGF expression, as determined by RT-PCR

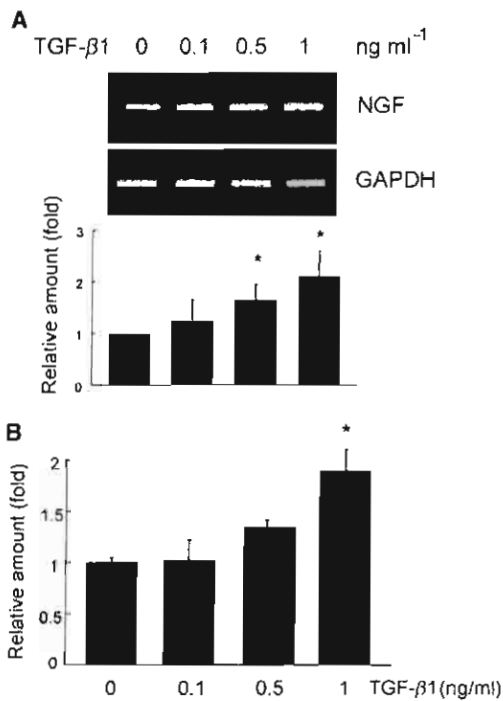


Fig. 1. Effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on nerve growth factor (NGF) mRNA expression (A) and protein secretion (B) in human dental pulp (HDP) cells. Cells were treated with 0, 0.1, 0.5 or 1 ng ml⁻¹ of TGF- β 1 for 24 h in serum-free culture conditions. (A) The polymerase chain reaction (PCR) products revealed the up-regulation of NGF in a dose-dependent manner. The average density $\pm$ standard deviation (SD) of the PCR product from three gels is shown in the bar chart. (B) The level of NGF protein, assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), increased in a pattern similar to that of NGF mRNA. The results are expressed as mean $\pm$ SD from three different experiments. * $P < 0.05$ compared with the non-treated condition. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

(Fig. 1A) and ELISA (Fig. 1B). In this experiment, HDP cells were stimulated with 0, 0.1, 0.5 or 1 ng ml⁻¹ of TGF- β 1 for 24 h. Statistical analysis showed that NGF protein secretion significantly increased at 1 ng ml⁻¹ of TGF- β 1 (Fig. 1B), and this concentration was selected for subsequent experiments. In the time-course experiment, an increase in NGF mRNA expression could be detected as early as 4 h after TGF- β 1 treatment (Fig. 2A). However, a significant increase of protein secretion was observed at 8 h after stimulation (Fig. 2B).

To address a possible involvement of MAPK pathways, specific inhibitors for p38 MAPK, JNK, and ERK1/2 were used to inhibit the stimulatory effect of TGF- β 1. We found that p38 inhibitor (2.6 μ M) and JNK inhibitor (40 nM) diminished NGF expression and secretion, whereas ERK inhibitor (2.5 μ M) did not exhibit any significant inhibitory effect (Fig. 3). This suggests that TGF- β 1 signals through p38 and JNK to stimulate NGF expression. To confirm the role of MAPK in TGF- β 1 signaling, the levels of the active/

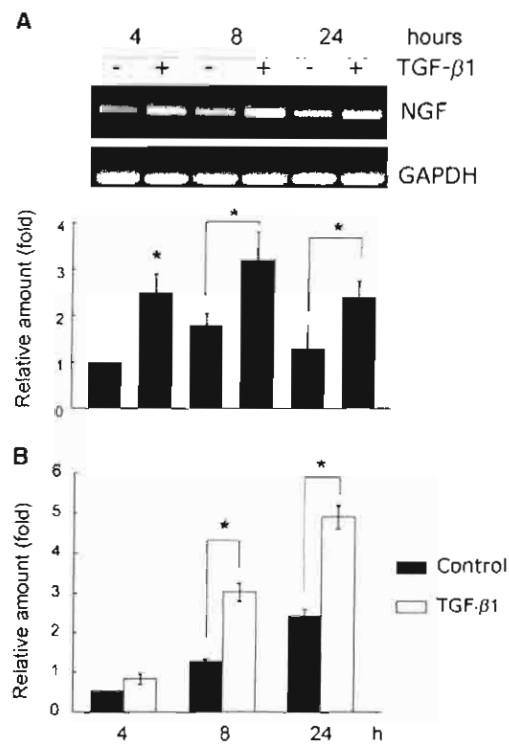


Fig. 2. Effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on nerve growth factor (NGF) mRNA (A) and protein (B) expression after different duration of treatment. Human dental pulp (HDP) cells were stimulated with TGF- β 1 for 4, 8 or 24 h, as described in the Material and methods. The results obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (A) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (B) showed that TGF- β 1 stimulated the expression of NGF as early as 4 h, and a marked increase was evident at 8 h ($\approx$ 2.2–2.5-fold). The bar charts of (A) and (B) show the average density $\pm$ standard deviation (SD) of the PCR product and the results obtained from ELISA, respectively, from three different experiments. -, Without TGF- β 1 stimulation; +, with TGF- β 1 stimulation. * $P < 0.05$ compared with the control. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

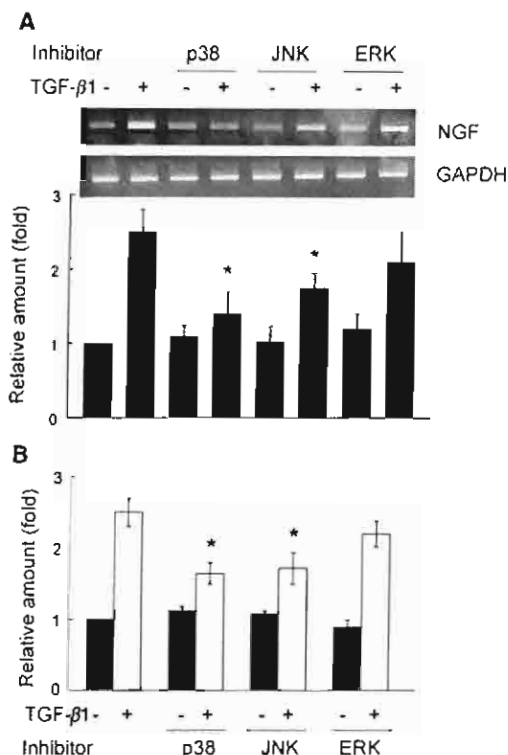


Fig. 3. The effects of upstream inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase (p38), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and extracellular signal-regulated kinase (ERK) on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-induced expression of nerve growth factor (NGF) in human dental pulp (HDP) cells. Cells were pre-incubated with 2.6 μ M p38 MAPK inhibitor (SB203580), 40 nM JNK inhibitor (SP600125), or 2.5 μ M ERK activation inhibitor for 1 h before treatment with 1 ng ml⁻¹ of TGF- β 1 for another 8 h. The expression of NGF mRNA (A) and protein (B) was attenuated by p38 MAPK and JNK inhibitor, but not by ERK activation inhibitor. The bar charts in (A) and (B) show the average density $\pm$ standard deviation (SD) of the polymerase chain reaction (PCR) product and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) results, respectively, from three independent experiments. * P < 0.05 compared with the TGF- β 1-treated (+) control. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

phosphorylated forms of p38 MAPK, JNK, and ERK1/2 were evaluated. The result, as illustrated in Fig. 4, indicated that there were increasing levels of p-p38 MAPK and p-JNK, but not of p-ERK, after treatment with TGF- β 1.

The role of MAPK was further investigated by examining the signaling mediators involved in MAPK activation. Cells were pre-incubated with SB225002 (a G-protein-coupled receptor inhibitor) or staurosporine (a serine/threonine kinase inhibitor) for 1 h prior to application of TGF- β 1. The results showed that both SB225002 (22 nM) and staurosporine (4 nM) could partially inhibit the TGF- β 1-induced NGF mRNA expression, as well as protein secretion, in HDP cells (Fig. 5). Interestingly, the effect of SB225002 on active MAPK was different from that of staurosporine [i.e. SB225002 blocked activation of p38 MAPK (Fig. 6A), whereas staurosporine inhibited JNK activation (Fig. 6B)].

Discussion

Transforming growth factor- β 1 and NGF are believed to play a role in response to dental pulp injury. TGF- β 1 is involved in tissue repair and remodeling, whereas NGF has been proposed to contribute as a chemoattractant for innervation (6, 9, 15). In the present study, we demonstrated that TGF- β 1 may induce mRNA expression and protein secretion of NGF in cultured HDP cells. The results support the hypothesis that TGF- β 1 released into pulp tissue following injury can stimulate pulp cells to secrete NGF and consequently affect odontoblast survival or odontoblast-like cell differentiation.

Pulp cells could be a source of NGF detected on odontoblasts because transcripts for NGF and TrkA receptors were not detected in odontoblasts (15). In addition, p75^{NTR}, another neurotrophin receptor expressed in polarizing odontoblasts, disappears as the cells become functional and thus is not detected in human odontoblasts *in vivo* (23, 24). In contrast, adjacent subodontoblastic pulp cells express both NGF and p75^{NTR} (6), suggesting that NGF produced by pulp cells might bind to odontoblasts and affect their behavior. MAGLORIE *et al.* (4) demonstrated that NGF application led to the presence of p75^{NTR} on odontoblasts and cells of the subodontoblastic layer, as well as on fine nerve fibrils. The results of the present study support the idea that pulp cells could be a source of NGF and that TGF- β 1 is associated with pulp repair through the induction of NGF.

The role of NGF in soft tissue repair has also been reported. NGF is constitutively produced in human and rat corneas. After corneal injury, acceleration in healing is associated with an increase in NGF level, and treatment with topical NGF can induce healing and restore corneal sensitivity (16). In addition, topical NGF application to a cutaneous wound also accelerates the rate of wound healing in mice (18). The expression of p75^{NTR} receptor in pulp cells suggests that these pulp cells could respond to NGF. However, the influence of NGF on the behavior of pulp cells requires further investigation.

TGF- β 1 signaling is mediated by the binding of TGF- β 1 to its heteromeric receptor complexes, consisting of serine/threonine TGF- β type I and type II receptors, leading to phosphorylation of the signal transducer proteins, Smad2 and 3. On phosphorylation, these proteins consequently form complexes with Smad4 and translocate to the nucleus to regulate gene expression (25, 26). In addition, recent evidence elucidated the non-Smad pathways of TGF- β 1 signaling. Activated TGF- β receptor complex could signal through several signaling pathways, including the MAPKs, PI3K, and PP2A/p70s6K (27). In the present study, we found that TGF- β 1 induces NGF in HDP cells through the cascades of MAPK, mainly JNK and p38 kinases. These findings concur with a recent publication reporting TGF- β 1 activation of the MAPK signaling cascades. The activation of JNK and p38 kinases after TGF- β 1 stimulation has been well documented. For example, it has been shown that TGF- β 1 induces fibronectin synthesis in fibrosarcoma through activated JNK, and the induction

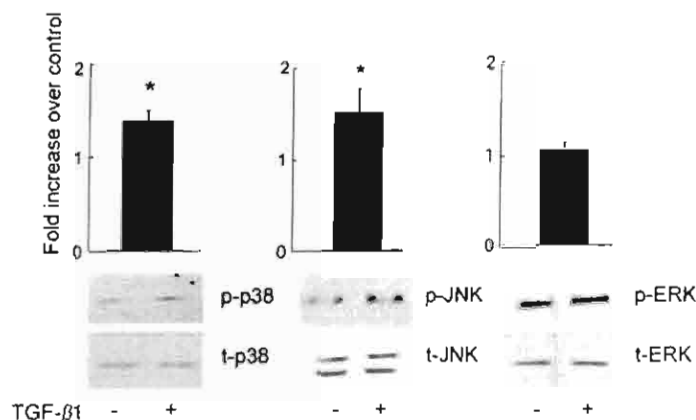


Fig. 4. Effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38), Jun N-terminal kinase (JNK), and extracellular signal-regulated kinase (ERK). Human dental pulp (HDP) cells were treated with 1 ng ml^{-1} of TGF- β 1 in serum-free medium for 30 min. The cell protein was extracted under ice-cold conditions and collected for Western blot analysis. The activation of p38 MAPK (p-p38) and JNK (p-JNK), but not of ERK (p-ERK), was observed. The density of each band was determined by image-analysis software. The bar charts represent the fold increase of each active form normalized to its total protein. * $P < 0.05$ compared with the control. -, Without TGF- β 1 stimulation; +, with TGF- β 1 stimulation; p, phospho; t, total.

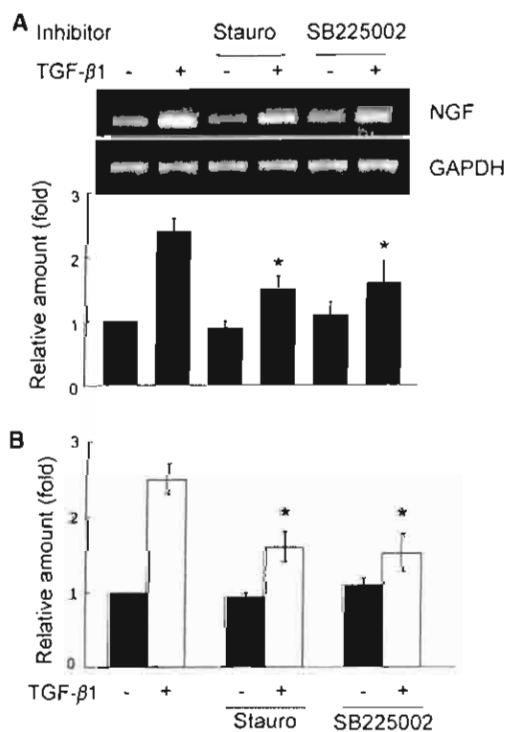


Fig. 5. Inhibitory effect of staurosporine and SB225002 on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-mediated expression of nerve growth factor (NGF) in human dental pulp (HDP) cells. Cells were pre-incubated with 22 nM SB225002 or 4 nM staurosporine for 1 h before the addition of 1 ng ml^{-1} of TGF- β 1. Both staurosporine and SB225002 partially inhibited the expression of TGF- β 1-mediated induction of NGF (A). The concentration of NGF protein was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the results are shown in (B). The charts in (A) and (B) represent the average density $\pm$ standard deviation of the polymerase chain reaction (PCR) product and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively, from three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with the TGF- β 1-treated (+) control. Stauro, staurosporine. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

of collagen synthesis in myofibroblasts was shown to be signaled through p38 kinase (28,29).

In the present study we found that TGF- β 1 activates p38 MAPK and JNK, and that the effect can be partially abolished by different inhibitors. By contrast, ERK kinase is not involved in the TGF- β 1-mediated induction of NGF, because ERK inhibitor could not inhibit the induction. In addition, the partial inhibition by both p38 MAPK and JNK inhibitors suggests that both kinases independently participate in the TGF- β 1-mediated induction of NGF. This hypothesis is further supported by the evidence that the application of staurosporine, a serine/threonine kinase inhibitor, and SB225002, a G-protein-coupled receptor inhibitor, resulted in the partial blockade of NGF induction. However, staurosporine inhibited the phosphorylation and activation of JNK, whereas SB225002 affected the activation of p38 MAPK. The results suggest that both MAPKs make use of different upstream signaling mediators in NGF regulation.

The function of staurosporine is to inhibit serine/threonine kinase. This suggests that staurosporine interferes with the signaling pathway of the TGF- β 1 receptor to Smad2/3. In addition, a reduction of p-JNK by staurosporine indicates that the TGF- β /Smad pathway induces NGF expression through JNK. However, the partial inhibition of NGF secretion by both p38 MAPK inhibitor and staurosporine also suggests the existence of another pathway of TGF- β 1 for the induction of NGF in HDP cells. The fact that SB225002 also showed a partial inhibition of NGF secretion and inhibited p38 MAPK activation, indicates that a signal through the G-protein-coupled receptor is involved in the TGF- β 1-mediated induction of NGF, possibly through p38 MAPK.

Crosstalk of TGF- β 1 signaling with other pathways has been reported. We have previously reported the association between TGF- β 1 and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ signaling pathways on alkaline phosphatase activity and SPARC

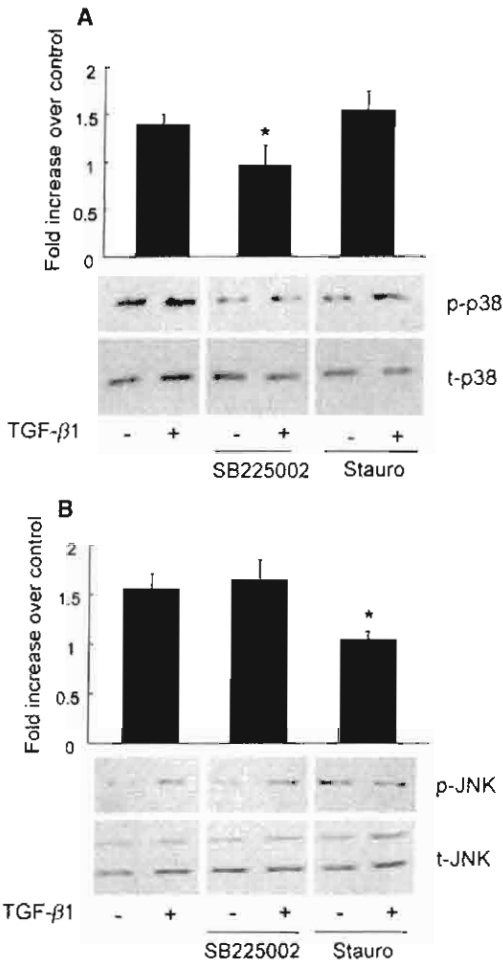


Fig. 6. (A) Effect of staurosporine and SB225002 on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-activated p38 mitogen-activated protein kinase (p38). Each inhibitor was added to the culture 1 h before treatment with 1 ng ml⁻¹ of TGF- β 1 for 30 min. Western blot analysis showed that SB225002 inhibited TGF- β 1-induced p38 MAPK activation. The data shown represent the fold increase of activation normalized to its total protein. * P < 0.05 when compared with the TGF- β 1-treated (+) control. p, phospho; t, total. (B) Effect of staurosporine and SB225002 on transforming growth factor (TGF- β 1)-activated Jun N-terminal kinase (JNK). The inhibitor was added to the culture, as described for (A). Staurosporine inhibited TGF- β 1-induced-p-JNK. The data shown represent the fold increase of activation normalized to its total protein. * P < 0.05 compared with the TGF- β 1-treated (+) control. p, phospho; Stauro, staurosporine; t, total.

synthesis in HDP cells (30). Kim *et al.* (31) demonstrated crosstalk between integrin and TGF- β 1 pathways in the adhesion of gastric carcinoma cells. The results of this study suggest crosstalk between TGF- β 1 receptor and G-protein-coupled receptor signaling pathways in NGF induction.

In conclusion, the results from this study clearly demonstrate that TGF- β 1 induces NGF mRNA expression and protein synthesis in HDP cells. This could be one of the mechanisms essential for pulp tissue repair and re-innervation. The signals mediated by TGF- β 1 involve the activation of MAPK, especially p38 kinase and JNK. Furthermore, crosstalk between TGF- β 1 and

G-protein-coupled receptor signaling may participate in the NGF inductive mechanism.

Acknowledgements – The authors thank Miss Kanokporn Lertsirirangson and Miss Uthaiwan Arayatrakoolikit for their excellent technical assistance. Dr Ray Sone Horijitra, Kanok porn Bhalang and Oranart Matangkasombut looked closely at, corrected and offered suggestions for improvement of the final version for English style and grammar. This work is supported by the Thai Research Fund (TRF Grant no. RSA 4780007) and the Ratchadaphisek Somphot Endowment for Research and Research Unit at Chulalongkorn University.

References

1. LESOT H, SMITH AJ, TZIAFAS D, BÉGUE-KIRN C, CASSIDY N, RUCH JV. Biological active molecules and dental tissue repair: a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation *in vitro*. *Cell Mater* 1994; 4: 199–218.
2. RUCH JV, LESOT H, BÉGUE CK. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 51–68.
3. SMITH AJ, TOBIAS RS, MURRAY PE. Transdental stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentine matrix components. *J Dent* 2001; 29: 341–346.
4. MAGLOIRE H, ROMEAS A, MELIN M, COUBLE ML, BLEICHER F, FARGES JC. Molecular regulation of odontoblast activity under dentine injury. *Adv Dent Res* 2001; 15: 46–50.
5. TZIAFAS D, PAPADIMITRIOU S. Role of exogenous TGF- β in induction of reparative dentinogenesis *in vivo*. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 192–196.
6. BYERS MR, WHEELER EF, BOTHWELL M. Altered expression of NGF and p75 NGF-receptor mRNA by fibroblasts of injured teeth precedes sensory nerve sprouting. *Growth Factors* 1992; 6: 41–52.
7. D'SOUZA RN, HAPPONEN RP, RITTER NM, BUTLER WT. Temporal and spatial patterns of transforming growth factor- α expression in developing rat molars. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 957–965.
8. INAGE T, TODA Y. Gene expression of TGF- α and elaboration of extracellular matrix using *in situ* hybridization and EM radioautography during dentinogenesis. *Anat Rec* 1996; 245: 250–266.
9. TZIAFAS D, SMITH AJ, LESOT H. Designing new treatment strategies in vital therapy. *J Dent* 2000; 28: 77–92.
10. SLOAN AJ, SMITH AJ. Stimulation of the dentin-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- β isoforms 1–3 *in vitro*. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 149–156.
11. BARBACID M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 148–155.
12. BYERS MR, SCHATTEMAN GC, BOTHWELL M. Multiple functions for NGF receptor in developing, aging and injured rat teeth are suggested by epithelial, mesenchymal, and neural immunoreactivity. *Development* 1990; 109: 461–471.
13. MITSIADES TA, DICOU E, JOFFRE A, MAGLOIRE H. Immunohistochemical localization of nerve growth factor (NGF) and NGF receptor (NGF-R) in the developing first molar tooth of the rat. *Differentiation* 1992; 49: 47–61.
14. LILLESÅAR C, ERIKSSON C, FRIED K. Rat tooth pulp cells elicit neurite growth from trigeminal neurons and express mRNAs for neurotrophic factors *in vitro*. *Neurosci Lett* 2001; 308: 161–164.
15. WOODNUTT DA, WAGER-MILLER J, O'NEILL PC, BOTHWELL M, BYERS MR. Neurotrophin receptors and nerve growth factor are differentially expressed in adjacent nonneuronal cells of normal and injured tooth pulp. *Cell Tissue Res* 2000; 299: 225–236.
16. LAMBIASE A, MANNI L, BONINI S, RAMA P, MICERA A, ALOE L. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural,

- biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 1063–1069.
17. CANTARELLA G, LEMPEREUR L, PRESTA M, RIBATTI D, LOMBARDO G, LAZAROVICI P, ZAPPALA G, PAFUMI C, BERNARDINI R. Nerve growth factor–endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J* 2002; **16**: 1307–1309.
 18. MATSUDA H, KOYAMA H, SATO H, SAWADA J, ITAKURA A, TANAKA A, MATSUMOTO M, KONNO K, USHIO H, MATSUDA K. Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. *J Exp Med* 1998; **187**: 297–306.
 19. NOSRAT IV, WIDENFALK J, OLSON L, NOSRAT CA. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol* 2001; **238**: 120–132.
 20. NOSRAT IV, SMITH CA, MULLALLY P, OLSON L, NOSRAT CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci* 2004; **19**: 2388–2398.
 21. LINDHOLM D, HENGERER B, ZAFRA F, THOENEN H. Transforming growth factor-beta 1 stimulates expression of nerve growth factor in the rat CNS. *Neuroreport* 1990; **1**: 9–12.
 22. LINDHOLM D, CASTRÉN E, KIEFER R, ZAFRA F, THOENEN H. Transforming growth factor- β 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 1992; **117**: 395–400.
 23. SATO O, MAEDA T, KANNARI K, IWANAGA T, FUJITA T. Immunohistochemical demonstration of nerve growth factor receptor in human teeth. *Biomed Res* 1990; **11**: 353–358.
 24. MAEDA T, SATO T, IWANAGA T, TAKANO Y. Immunohistochemical localization of nerve growth factor receptor (NGF-R) in human teeth. *Proc Finn Dent Soc* 1992; **88**: 557–562.
 25. MASSAGUE J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; **1**: 169–178.
 26. MASSAGUE J, WOTTON D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000; **19**: 1745–1754.
 27. SHI Y, MASSAGUE J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; **113**: 685–700.
 28. HOCEVAR BA, BROWN TL, HOWE PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 1999; **18**: 1345–1356.
 29. RODRIGUEZ-BARBERO A, OBREO J, YUSTE L, MONTERO JC, RODRIGUEZ-PENA A, PANDIELLA A, BERNABEU C, LOPEZ-NOVOA JM. Transforming growth factor-beta1 induces collagen synthesis and accumulation via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in cultured L(6)E(9) myoblasts. *FEBS Lett* 2002; **513**: 282–288.
 30. PAVASANT P, YONGCHAITRAKUL T, PATTAMAPUN K, ARKSORNNUKIT 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**: 717–722.
 31. KIM HP, LEE MS, YU J, PARK JA, JONG HS, KIM TY, LEE JW, BANG YJ. TGF-beta1 (transforming growth factor-beta1)-mediated adhesion of gastric carcinoma cells involves a decrease in Ras/ERKs (extracellular-signal-regulated kinases) cascade activity dependent on c-Src activity. *Biochem J* 2004; **379**: 141–150.

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;33:1057–1060)

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@trueemail.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

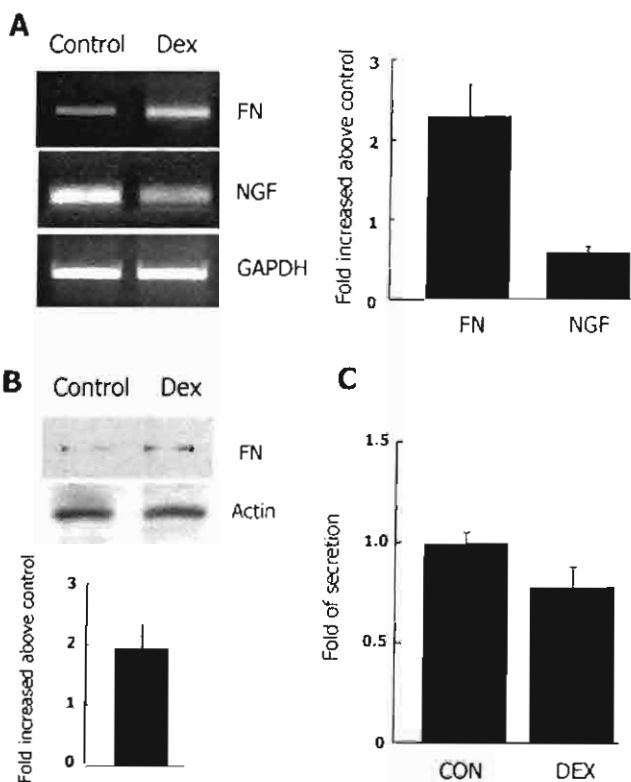


Figure 1. Dexamethasone induced fibronectin synthesis but reduced NGF secretion in dental pulp cells. Cells were treated with 200 nmol/L of dexamethasone for 24 hours. (A) The results from reverse-transcription PCR showed the effects of dexamethasone on the expression of fibronectin and NGF. The graph 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.

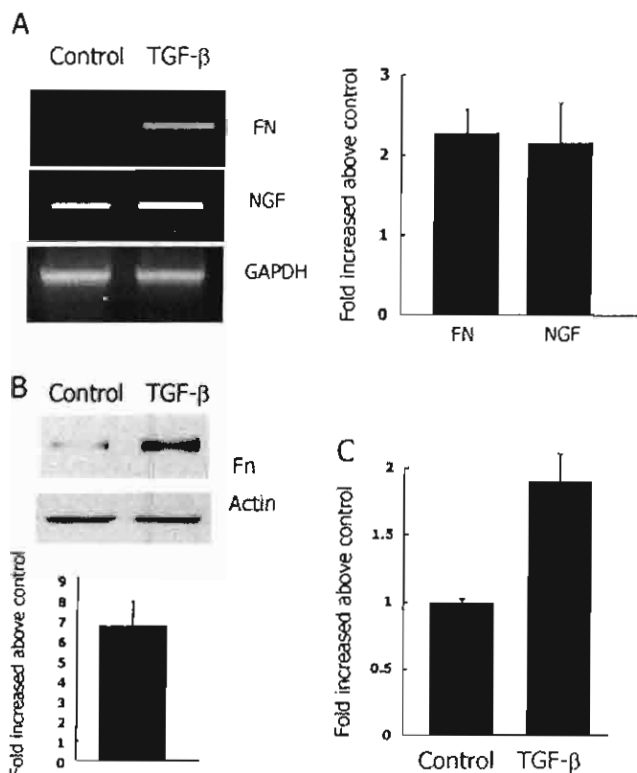


Figure 2. TGF- β 1 induced fibronectin and NGF expression in dental pulp cells. Cells were treated with 1 ng/mL of TGF- β 1 for 24 hours. Reverse-transcription PCR analyses of fibronectin and NGF were shown in Figure 2A, and the mean $\pm$ SD of band density from three separate experiments was shown 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.

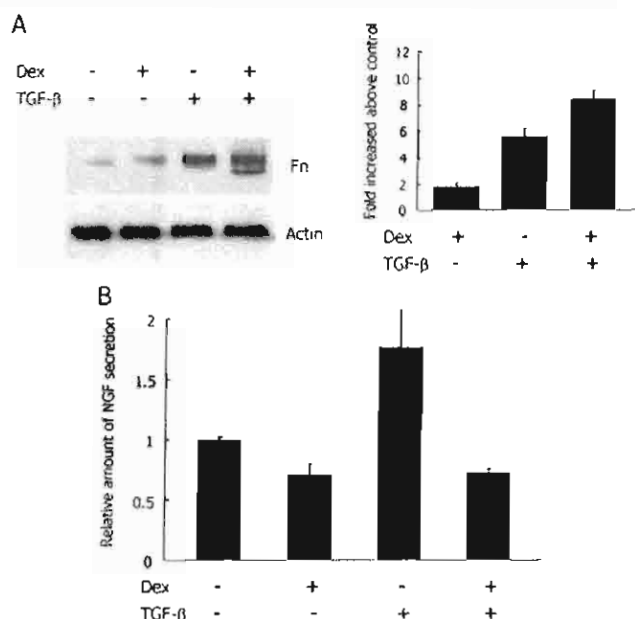


Figure 3. Combination effects of dexamethasone and TGF- β 1 on dental pulp cells. Cells were treated for 24 hours with either 200 nmol/L of dexamethasone alone or 1 ng/mL of TGF- β 1 alone or both reagents together. The changes in (A) protein level of fibronectin and (B) NGF were analyzed by Western 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.
- Yzias 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 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.
- 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. *End 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, Pilaru S, Lokice 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, Pung L, Tan H, Zhou X. HGF enhanced proliferation and differentiation of dental pulp cells. *J Endod* 2006;32:736–41.
15. Melin M, Joffe-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. Pianelli 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. Wisithiphrom 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, Puttapanit K, Arksornnukit 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 C, 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, Shagranianova 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. Tziatas 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. Woodruff 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, Fabrizio 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.

ORIGINAL ARTICLE

Secreted protein acidic, rich in cysteine induces pulp cell migration via $\alpha v \beta 3$ integrin and extracellular signal-regulated kinase

P Pavasant, T Yongchaitrakul

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

AIM: The aim of this study was to investigate the influence of secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC) on the migration of human dental pulp (HDP) cells.

METHODS: Secreted protein acidic, rich in cysteine was applied in the lower chamber of the chemotaxis apparatus and migration was determined by counting the cells that migrated through the membrane. To determine the signaling pathway involved, cells were incubated with inhibitors for 30 min prior to the migration assay.

RESULTS: The results indicated that SPARC induced HDP cell migration in a dose-dependent manner via extracellular signal-regulated kinase (ERK). The migration could be inhibited both by the anti- $\alpha v \beta 3$ integrin antibody and by suramin, a non-selective growth factor receptor and G-protein coupled receptor antagonists. The anti- $\alpha v \beta 3$ integrin antibody could also inhibit ERK activation, suggesting the possible role of $\alpha v \beta 3$ integrin on the regulation of ERK and cell migration. Interestingly, both suramin and SB225002, another G-protein coupled receptor antagonist, suppressed ERK activation.

CONCLUSIONS: Secreted protein acidic, rich in cysteine could act as a chemotactic factor and facilitate migration, possibly through the G-protein coupled receptor, $\alpha v \beta 3$ integrin and ERK. The data support that SPARC could play a crucial role in dental pulp tissue repair by inducing dental pulp cell migration.

Oral Diseases (2007) doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01383.x

Keywords: $\alpha v \beta 3$ integrin; dental pulp cells; extracellular signal-regulated kinase; migration; SPARC

Introduction

Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), belongs to a family of matricellular protein that involves

in cell-matrix interaction and regulation of cell behavior. SPARC is a non-collagenous protein found abundantly in bone and dentin. In addition, it is expressed in soft connective tissue in several areas, especially in the tissue that undergoes the process of remodeling or repair.

It has been suggested that the function of this protein is involved in the healing process of soft connective tissue. SPARC was shown to influence a variety of cellular activities *in vitro*, including angiogenesis, inhibition of cell proliferation, modulation of the synthesis of extracellular matrix and secretion of matrix metalloproteinase (Lane and Sage, 1994; Bradshaw and Sage, 2001). SPARC also plays a role in bone metabolism. Results obtained from SPARC-null mice indicate that SPARC participates in the maturation of osteoblasts and regulation of bone mass (Delany *et al*, 2003).

Secreted protein acidic, rich in cysteine has been considered to be involved in wound healing. For instance, accumulation of SPARC was found in the region of corneal repair (Berryhill *et al*, 2003). In dental tissue, SPARC was detected around odontoblasts in dental pulp, including predentin and dentinal tubule. *In situ* hybridization and immunohistological studies revealed that odontoblasts, but not pulp cells, synthesized SPARC (Reichert *et al*, 1992; Takano-Yamamoto *et al*, 1994). The increasing amount of SPARC around the odontoblastic layer after cavity preparation suggests that SPARC might play a role in the initial stage of tertiary dentine formation (Itota *et al*, 2001). Furthermore, SPARC could increase dental pulp cell proliferation (Shiba *et al*, 2001). It is possible that SPARC involves the process of repair and regeneration of dentin-pulp complex.

The function of SPARC in cell migration has been reported. SPARC promoted human prostate cancer cell migration through $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrin (De *et al*, 2003). In addition, Wu *et al* (2006) reported that SPARC regulated mouse embryo fibroblast migration during the healing process of myocardium and the expression of SPARC was regulated by αv integrin. These studies suggest that interaction between SPARC

Correspondence: P Pavasant, Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand. Tel: +66 2 218 8872, Fax: +66 2 218 8870, E-mail: prasisit215@gmail.com

Received 9 October 2006; revised 28 November 2006; accepted 5 December 2006

and integrins is involved in cell migration during tumor growth or wound repair of certain tissues.

We hypothesize that SPARC can induce migration of dental pulp cells toward the odontoblastic layer after pulp injury, as cell migration is considered one of the initial processes in connective tissue repair. The purpose of this study was to investigate the inductive ability of SPARC in the migration of human dental pulp (HDP) cells.

Materials and methods

Cell culture

Human dental pulp cells were obtained from caries-free lower third molars extracted for orthodontic reason with the patients' informed consent. The protocol was approved by the ethical committee, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. The teeth were washed once with 70% ethanol and split longitudinally with a diamond disk under water-cooling. The pulp tissues were gently removed by forceps, cut into pieces and placed in a 35-mm culture dish (Nunc, Naperville, IL, USA). The explants were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 IU ml⁻¹ penicillin G, 100 IU ml⁻¹ streptomycin and 0.25 µg ml⁻¹ amphotericin B and incubated at 37°C in 5% CO₂. The medium and all supplements were from Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA. After the outgrowth cells reached confluence, they were subcultured into new culture dishes. HDP cells were prepared from three teeth obtained from three donors and cells from passage three were used in the experiments.

Migration assay

The migration assay was modified from the method described for an invasion assay (Chen, 2005). Cells were removed from the culture plate using PBS-EDTA buffer and suspended in 1% serum containing medium at a density of 1×10^6 cells ml⁻¹, and 56 µl of media (~56 000 cells) was seeded into the upper chambers of a 48-well chemotaxis chamber (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA). The lower chambers were filled with 1% serum containing medium with or without SPARC (from bovine bone; Calbiochem, San Diego, CA, USA). They were separated from the upper wells by an 8-µm pore-size polycarbonate membrane filter (Neuroprobe). Cells were incubated for 16 h at 37°C in 5% CO₂ humidified condition and then fixed with 4% formaldehyde before staining with hematoxylin. Cells on the upper surface of the membrane were removed with a cotton swab and those on the lower surface were counted under a light microscope.

For inhibitory experiments, cells were incubated with inhibitors or an inhibitory antibody for 30 min before being seeded in the upper chambers. The inhibitors used were 2.5 µM extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor (ERK activator inhibitor peptide 1; ste-MEK1₁₃), 35 nM p38 kinase inhibitor (SB203580), 40 nM c-JUN NH₂-terminal kinase (JNK) inhibitor (SP600125), 1.2 nM Rho kinase inhibitor, 15 µM

suramin and 22 nM G-protein coupled receptor antagonist (SB225002). All inhibitors were obtained from Calbiochem. Alphavbeta3 inhibitory antibody (20 µg ml⁻¹; Clone LM609) was obtained from Chemicon International (Temecula, CA, USA).

Western blot analysis for phospho-ERK (p-ERK)

Human dental pulp cells were seeded at 100 000 cells ml⁻¹ onto a 12-well culture plate (Nunc) for 1 day before being treated with 5 µg ml⁻¹ SPARC in the 1% FBS-containing medium for 30 min. For inhibitory experiments, cells were incubated with inhibitors or an inhibitory antibody for 1 h before being treated with SPARC. Cells were extracted with radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer containing 50 mM sodium fluoride and 50 mM sodium orthovanadate, and the extracts were subjected to 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. The nitrocellulose was incubated in 5% non-fat milk (Difco, Sparks, MD, USA) for 1 h and stained overnight at 4°C for p-ERK1/2 (affinity-purified rabbit anti-p-ERK1/2 antibody, T202/T204) or total ERK1/2 (mouse monoclonal antibody) (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). The nitrocellulose sheet was washed and incubated with biotinylated secondary antibodies and peroxidase labeled streptavidin (Zymed, South San Francisco, CA, USA). Finally, the nitrocellulose was coated with chemiluminescent reagent and the signal was captured with CL-XposureTM (Pierce, Rockford, IL, USA). The band intensity was determined by Scion Image analysis software.

Statistic analysis

All data were analyzed using a one-way analysis of variance. Scheffe's test was used for *post hoc* analysis ($P < 0.05$).

Results

The results from Figure 1 indicated that SPARC could induce migration of HDP cells across the polycarbonate membrane. The chemotactic effect of SPARC was observed in a dose-dependent manner ranging from 1 to 5 µg ml⁻¹. The number of cells that migrated across the membrane increased up to 2–2.5 folds above control when treated with 5 µg ml⁻¹ of SPARC. The dosage of 5 µg ml⁻¹ was then selected and used for the rest of the experiment.

Various inhibitors were applied to examine the possible pathways involved in the migration induced by SPARC. The result revealed that mitogen-activated protein kinase (MAPK) was involved in the mechanism of cell migration. Addition of the ERK inhibitor, but not the JNK or p38 MAPK inhibitor, could inhibit the chemotactic effect of SPARC up to 80%. However, Rho kinase had no effect on the migration induced by SPARC (Figure 2).

Interestingly, suramin, which can be both a non-selective growth factor receptor and a G-protein coupled receptor antagonist, could also inhibit the chemotactic effect of SPARC. These results suggest that SPARC

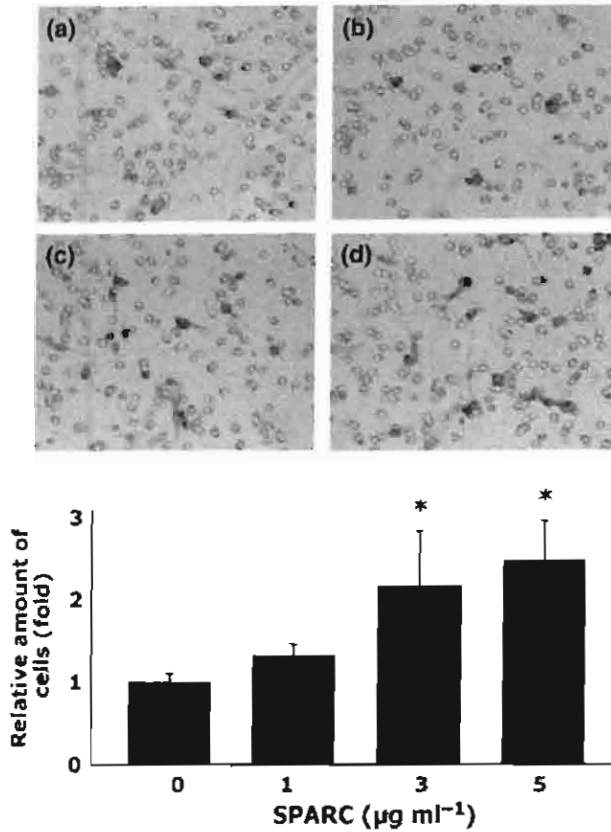


Figure 1 The figure shows the number of human dental pulp cells that migrated across the membrane in the migration assay using a 48-well chemotaxis chamber. Cells were seeded on the membrane in the upper chambers for 16 h and allowed to migrate across the membrane. Lower chambers contained medium supplied with 0, 1, 3 or 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of secreted protein acidic, rich in cysteine. The number of cells that migrated increased in a dose-dependent manner and up to 2–2.5 folds at 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The graph represents the relative number of cells from three separated experiments. Data are represented as mean $\pm$ s.d. (*) denotes $P < 0.05$ when compared with non-treated condition

may signal through a certain growth factor receptor, or alternatively through the dissociation of the G-protein from the receptor. Application of an inhibitory antibody against $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin could also diminish the effect of SPARC, as shown in Figure 3.

To investigate further whether the signal by SPARC was through the ERK pathway, we examined the activation of ERK in SPARC-treated HDP cells. Figure 4 revealed that SPARC was able to stimulate p-ERK and the effect was suppressed by the presence of suramin and the $\alpha\text{v}\beta 3$ inhibitory antibody. SB225002 was used to confirm the involvement of the G-protein coupled receptor. We found that ERK activation was partially blocked in the presence of SB225002. The intensity of the bands normalized to total ERK was shown as a graph (Figure 4).

Discussion

The results from this study indicate that SPARC may function as a chemotactic factor for dental pulp cells. The results are in agreement with the previous report

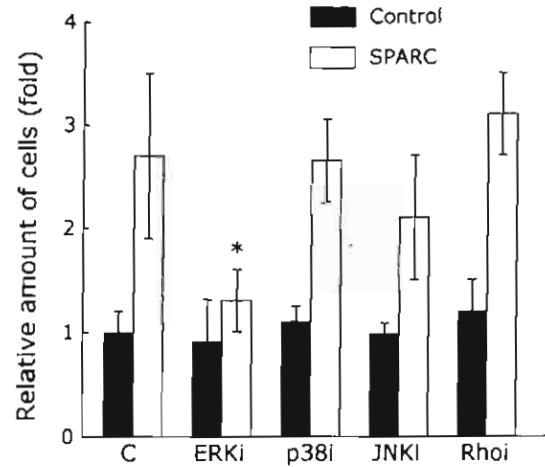


Figure 2 The graph shows the inhibitory effect of inhibitors on secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC)-induced cell migration. Cells were incubated with each kind of inhibitor (2.5 μM ERKi, 35 nM p38i, 40 nM JNKi or 1.2 nM Rhoi) for 30 min before being seeded in the upper chambers. Cells were allowed to migrate towards the other side of the membrane, which was in contact with the medium containing 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ SPARC in the lower chambers, for 16 h. The inhibitory effect was exhibited by the ERK inhibitor, but not other mitogen-activated protein kinase or Rho inhibitors. The graph represents the relative amount of cells from three separated experiments. Data are represented as mean $\pm$ s.d. * $P < 0.05$ when compared with treated control

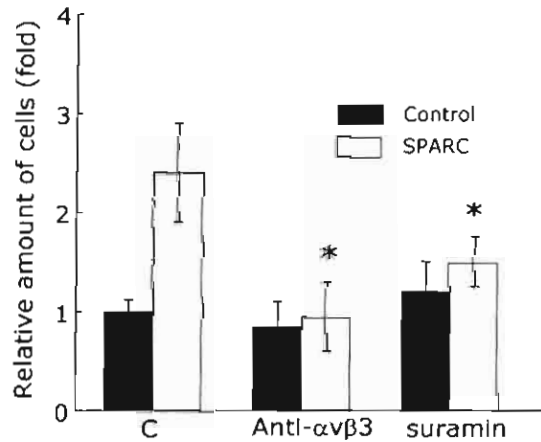


Figure 3 The graph shows the inhibition of secreted protein acidic, rich in cysteine-induced migration by suramin and the anti- $\alpha\text{v}\beta 3$ antibody. Cells were preincubated with either suramin or the anti- $\alpha\text{v}\beta 3$ antibody for 30 min prior to seeding. After 16 h, the migratory cells were fixed and counted. The migration could be significantly blocked by both suramin and the anti- $\alpha\text{v}\beta 3$ antibody. The graph represents the relative number of cells from three separated experiments. Data are represented as mean $\pm$ s.d. * $P < 0.05$ when compared with treated control

showing that SPARC could promote migration of prostate cancer cell line (De *et al*, 2003). In addition, SPARC enhanced the fibronectin-induced cell migration in mouse embryo fibroblasts (Wu *et al*, 2006). However, SPARC alone had no effect on cell migration in mouse fibroblasts, indicating that the chemotactic activity of SPARC on cell migration depends on certain cell type.

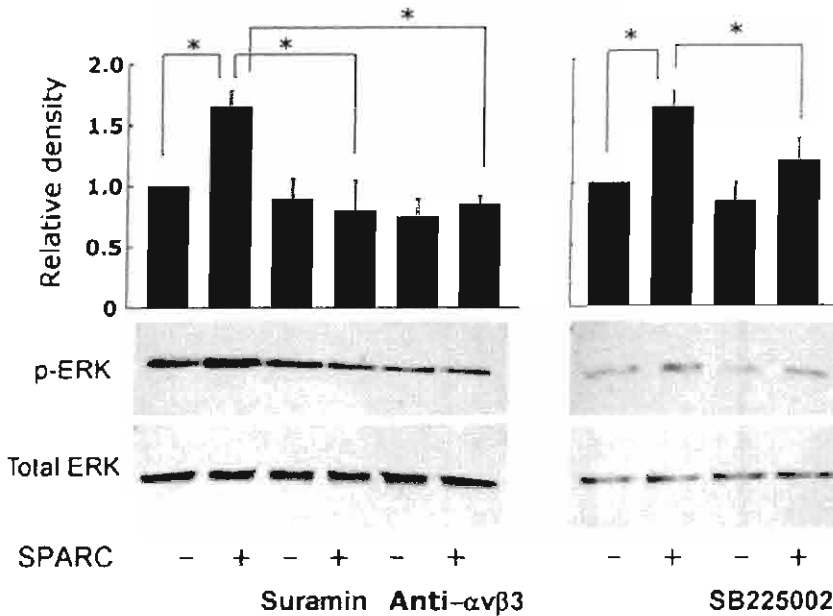


Figure 4 Western blot analysis demonstrates the effect of secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC) and blocking effect of suramin and the anti- $\alpha\beta 3$ antibody (left panel) and SB225002 (right panel) on ERK activation. Human dental pulp cells were pretreated with either suramin, the anti- $\alpha\beta 3$ antibody or SB225002 for 30 min before adding SPARC. SPARC significantly increased p-ERK. The effect could be suppressed by suramin and the anti- $\alpha\beta 3$ antibody and partially blocked by SB225002. The intensity of the bands normalized to total ERK is shown as a graph. Data are represented as mean $\pm$ s.d. from three separated experiments. * $P < 0.05$

Among the molecules responsible for dental pulp injury, SPARC has been reported to increase at the odontoblastic layer (Itota *et al*, 2001). However, the mechanism of the up-regulation of this molecule is unclear. TGF- β was also found in dental pulp after injury and is believed to play a role in repair (Tziafas and Papadimitriou, 1998; Magloire *et al*, 2001). We and the others previously reported that TGF- β could induce the synthesis of SPARC in dental pulp cells, and possibly the increase of TGF- β was involved in up-regulation of SPARC in dental pulp tissue (Shiba *et al*, 1998; Pavasant *et al*, 2003). Our results in this study demonstrate that SPARC functions by inducing migration of pulp cells, supporting the role of SPARC in the process of pulp tissue repair or regeneration. Potential roles of SPARC associated with the behavior of dental pulp cells in addition to migration are under investigation.

Dynamic integrin activation has been shown to be an essential requirement for cell migration (Huttenlocher *et al*, 1996; Palecek *et al*, 1997). Inhibitory action of an antibody against $\alpha\beta 3$ integrin on cell migration supports that such integrin is required for migration of dental pulp cells. Association of $\alpha\beta 3$ integrin in dental pulp cell migration is anticipated as it has been reported to regulate migration in several cell types, including the breast and ovarian cancer cells and vascular smooth muscle cells (Eliceiri *et al*, 1998; Hapke *et al*, 2003; Rolli *et al*, 2003).

The role of MAPK on cell migration has been reported (Huang *et al*, 2004). All three groups of MAPK, ERK, p38 and JNK, have been shown to participate in the migration of several cell types. However, only the ERK inhibitor could inhibit the migratory effect of SPARC in this study, suggesting that ERK is required for dental pulp cell migration.

Our results support that $\alpha\beta 3$ integrin regulated ERK and consequently induced dental pulp cell migration. It

has been evidenced that $\alpha\beta 3$ integrin can regulate the activity of ERK (Eliceiri *et al*, 1998; Roberts *et al*, 2003; Salaznyk *et al*, 2004). The signal from $\alpha\beta 3$ was required to sustain the activity of FGF-induced p-ERK in endothelial cells (Eliceiri *et al*, 1998). The inhibitory antibody against $\alpha\beta 3$ could inhibit collagen-induced ERK activation in human mesenchymal stem cells (Salaznyk *et al*, 2004). In addition, the association of ERK1 and $\alpha\beta 3$ integrin was required for spreading of Swiss and NIH3T3 cells on vitronectin (Roberts *et al*, 2003). All the studies above suggest the role of $\alpha\beta 3$ upstream of ERK.

Suramin, a polysulfonated naphthurea, inhibited the migration induced by SPARC in this study. Suramin has been shown to act as a non-selective growth factor receptor antagonist. It inhibits binding of ligands to several growth factor receptors, such as platelet-derived growth factor receptor, epidermal growth factor receptor or transforming growth factor receptor (Hosang, 1985; Coffey *et al*, 1987; Kopp and Pfeiffer, 1990). Young *et al* (1998) showed that SPARC signaled through tyrosine phosphorylation in endothelial cells, suggesting that SPARC might act through receptor tyrosine kinase. Recently, Kzhyshkowska *et al* (2006) demonstrated that SPARC interacted with stabilin-1, a scavenger receptor expressed by macrophage, suggesting that stabilin-1 facilitated SPARC internalization and degradation. However, the specific receptor for SPARC is unclear. Our results suggest that SPARC may act through one of the growth factor receptors in which binding was blocked by suramin.

Suramin can also act as an inhibitor of G-protein-coupled receptors (Beindl *et al*, 1996; Huang *et al*, 2004). Its action is to inhibit the association of G-protein α and $\beta\gamma$ subunits and uncouple the receptor from the G-protein (Chung and Kermode, 2005). Partial inhibition of ERK activation exerted by SB225002, a selective G-protein coupled receptor antagonist,

indicates an involvement of the G-protein coupled receptor. Thus, another possibility is that SPARC acts through a G-protein coupled receptor.

Interaction or crosstalk between the G-protein coupled receptor and integrin has been reported. During the mechanism of platelet aggregation, activation of $\alpha\text{IIb}\beta_3$ integrin required the stimulation of a G-protein-coupled receptor such as thrombin receptor (Shattil *et al*, 1998). Crosstalk between a G-protein-coupled receptor, CXCR4 and β_3 integrin was also an essential mechanism for migration and adhesion of hematopoietic precursors cells (Nakata *et al*, 2006). Interaction between a G-protein-coupled receptor and $\alpha\text{v}\beta_3$ integrin may also participate in the migration of dental pulp cells. Further investigation is needed to clarify this mechanism.

In conclusion, the results reveal that SPARC induces dental pulp cell migration and acts as a chemotactic factor. This ability of SPARC supports the function of this molecule in dental pulp tissue repair. Our results also suggest that SPARC could act either through $\alpha\text{v}\beta_3$ integrin or a G-protein coupled receptor. Interaction between a G-protein coupled receptor and an integrin signaling pathway could consequently induce cell migration through the activation of ERK. However, further investigation is needed to clarify the hypothesis.

Acknowledgements

We are very grateful to Ms Kanokporn Lertsirirungson for excellent technical assistance. This work is supported by Thai Research Fund (TRF) Grant no # RSA 4780007 and the Ratchadaphisek Somphot Endowment for Research, and the Research Unit, Chulalongkorn University.

References

Beindl W, Mitterauer T, Hohenegger M, IJzerman AP, Nanoff C, Freissmuth M (1996). Inhibition of receptor/G protein coupling by suramin analogues. *Mol Pharmacol* 50: 415–423.

Berryhill BL, Kane B, Stramer BM, Fini ME, Hassell JR (2003). Increased SPARC accumulation during corneal repair. *Exp Eye Res* 77: 85–92.

Bradshaw AD, Sage EH (2001). SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 107: 1049–1054.

Chen HC (2005). Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol* 294: 15–22.

Chung WC, Kermod JC (2005). Suramin disrupts receptor-G protein coupling by blocking association of G protein α and $\beta\gamma$ subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 191–198.

Coffey RJ Jr, Leof EB, Shipley GD, Moses HL (1987). Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells. *J Cell Physiol* 132: 143–148.

De S, Chen J, Narizhneva NV *et al* (2003). Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J Biol Chem* 278: 39044–39050.

Delany AM, Kalajic I, Bradshaw AD, Sage EH, Canalis E (2003). Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology* 144: 2588–2596.

Eliceiri BP, Klemke R, Strömblad S, Cheresh D (1998). Integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol* 140: 1255–1263.

Hapke S, Kessler H, Lubert B *et al* (2003). Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin $\alpha\text{v}(\beta_3)\beta_3$ /vitronectin interaction. *Biol Chem* 384: 1073–1083.

Hosang M (1985). Suramin binds to platelet-derived growth factor and inhibits its biological activity. *J Cell Biochem* 29: 265–273.

Huang C, Jacobson K, Schaller MD (2004). MAP kinase and cell migration. *J Cell Sci* 117: 4619–4628.

Huttenlocher A, Ginsberg MH, Horwitz AF (1996). Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol* 134: 1551–1562.

Itota T, Nishitani Y, Sogawa N, Sogawa C, Konishi N, Torii Y (2001). Alteration of odontoblast osteonectin expression following dental cavity preparation. *Arch Oral Biol* 46: 829–834.

Kopp R, Pfeiffer A (1990). Suramin alters phosphoinositide synthesis and inhibits growth factor receptor binding in HT-29 cells. *Cancer Res* 50: 6490–6496.

Kzhyshkowska J, Workman G, Cardo-Vila M *et al* (2006). Novel function of alternatively activated macrophages: Stabilin-1-mediated clearance of SPARC. *J Immunol* 176: 5825–5832.

Lane TF, Sage EH (1994). The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 8: 163–173.

Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC (2001). Molecular regulation of odontoblast activity under dentine injury. *Adv Dent Res* 15: 46–50.

Nakata Y, Tomkowicz B, Gewirtz AM, Ptasznik A (2006). Integrin inhibition through Lyn-dependent cross talk from CXCR4 chemokine receptor in normal human CD34⁺ marrow cells. *Blood* 107: 4234–4239.

Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 385: 537–540.

Pavanant P, Yongchaitrakul T, Pattamapun K, Arksornnukit M (2003). The synergistic effect of TGF- β and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on SPARC synthesis and alkaline phosphatase activity in human pulp fibroblasts. *Arch Oral Biol* 48: 717–722.

Reichert T, Storkel S, Becker K, Fisher LW (1992). The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study. *Calcif Tissue Int* 50: 468–472.

Roberts MS, Woods AJ, Shaw PE, Norman JC (2003). ERK1 associates with $\alpha\text{v}\beta_3$ integrin and regulates cell spreading on vitronectin. *J Biol Chem* 278: 1975–1985.

Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Felding-Habermann B (2003). Activated integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9482–9487.

Salaznyk RM, Klees RF, Hughlock MK, Plopper GE (2004). ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin. *Cell Commun Adhes* 11: 137–153.

Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N (1998). Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 91: 2645–2657.

- Shiba H, Fujita T, Doi N *et al* (1998). Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) and alkaline phosphatase by human pulp cell in culture. *J Cell Physiol* **174**: 194–205.
- Shiba H, Uchida Y, Kamihagi K *et al* (2001). Transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells. *J Dent Res* **80**: 1653–1659.
- Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, Nomura S (1994). Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem* **42**: 885–896.
- Tziafas D, Papadimitriou S (1998). Role of exogenous TGF-beta in induction of reparative dentinogenesis in vivo. *Eur J Oral Sci* **106**(Suppl): 192–196.
- Wu RX, Laser M, Han H *et al* (2006). Fibroblast migration after myocardial infarction is regulated by transient SPARC expression. *J Mol Med* **84**: 241–252.
- Young BA, Wang P, Goldblum SE (1998). The counteradhesive protein SPARC regulates an endothelial paracellular pathway through protein tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **251**: 320–327.