



國立臺灣大學牙醫專業學院臨床牙醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Clinical Dentistry

School of Dentistry

National Taiwan University

Master Thesis

轉化生長因子- $\beta$ 1 對人類牙髓細胞之纖維蛋白溶解活化系統的  
調控與訊息路徑傳導

Regulation and Signaling of TGF- $\beta$ 1 on the plasminogen  
activation system of human dental pulp cells

黃郁安

Yu-An Huang

指導教授：鄭景暉 博士

Advisor: Jiiang-Huei Jeng, Ph.D.

中華民國 104 年 6 月

June, 2015

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

轉化生長因子- $\beta$ 1 對人類牙髓細胞之纖維蛋白溶解活化系統的調控與訊息路徑傳導

Regulation and Signaling of TGF- $\beta$ 1 on the plasminogen activation system of human dental pulp cells

本論文係黃郁安君 (R01422017) 在國立臺灣大學臨床牙醫學系、所完成之碩士學位論文，於民國 104 年 6 月 25 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

郭宗偉

(簽名)

(指導教授)

呂善

林俊彬

張美姬

黃何雄

系主任、所長

郭宗偉

(簽名)

## 誌謝



這三年在台大牙髓病科的受訓與學習，至此已走到了尾聲。一路上感謝許多  
人的幫助與鼓勵，才讓我完成這段旅程。首先是指導老師鄭景暉教授，謝謝老師  
在臨床和研究上的鼓勵與關心，在實驗撞牆時不辭辛勞的指引我方向。謝謝牙髓  
病學科的林俊彬院長、林思洸醫師、蔡宜玲醫師和李苑玲醫師在學習上的教導，  
使我成長不少。謝謝彥臻學姐和敏為許多的建議，謝謝靖倫陪我手牽手一起度過  
這三年學生時光。謝謝凱哥、惠萍、佑珊的幫忙，謝謝莉婷、嬿伊、毓襄、舜中、  
竣為、佳鎂、耀仁、士緯、庭宜，我會懷念歡樂的午餐和零食時光！謝謝 R347 實  
驗團隊：穎成、奕君、孟儒、育雯、順華、欣樺、倚慧、盈吟，謝謝你們的幫助、  
容忍我這個實驗新手在裡面搗亂！

謝謝陳致秀主任、阮柏凱醫師、廖培棓醫師和馮聖偉醫師，感謝你們三年來  
的教導，拉拔一個小菜鳥長大。謝謝宜好、怡雯和育綺這麼多年來的打氣和吐槽，  
從考研究所開始能有你們的加油真好。

最後要感謝我的母親，總是容忍我、尊重我的決定，在兩段求學的階段給我  
最多的支持。謝謝庭毓，感謝你一直在我身邊，包容我、做我最強大的後盾。謹  
以此致感謝所有陪伴我的人，謝謝你們！

## 中文摘要



**實驗目的：**轉化生長因子- $\beta$ 1 (Transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 對於牙髓的修復與牙本質生成扮演重要的角色，包含細胞外基質 (Extracellular matrix, ECM) 的重塑。纖維蛋白溶解活化系統 (plasminogen activation system, PA system) 參與 ECM 的調控，然而關於 TGF- $\beta$ 1 和 PA 系統的相關性仍尚未瞭解。本研究目的在探討 TGF- $\beta$ 1 對於人類牙髓細胞的生長以及 PA 系統的影響，還有相關訊息路徑傳導。

**實驗方法：**使用 0.5, 1, 5, 10, 25 ng/mL TGF- $\beta$ 1 刺激人類牙髓細胞，以細胞存活率分析 (MTT assay)、反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)、西方墨點法 (Western Blot) 及免疫螢光法 (Immunofluorescence)，在 24 小時和 5 天兩個時間點檢測 TGF- $\beta$ 1 在細胞生長和尿激酶型纖維蛋白溶解酶原活化因子 (urokinase-type plasminogen activator, uPA)、尿激酶型纖維蛋白溶解酶原活化因子受體 (urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)、纖維蛋白溶解酶原活化因子抑制劑第一型 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、第一型膠原蛋白 (collagen I) 的影響。同時也分析 TGF- $\beta$ 1 對人類牙髓細胞 Smad2/3、TAK1 以及 ERK1/2 的活化；在某些實驗組別，則加入 SB431542 (ALK5/Smad2/3 抑制劑)、5z-7-oxozeanol (TAK1 抑制劑)、U0126 (MEK/ERK 抑制劑)，探討可能參與調控細胞反應的訊息傳遞路徑。

**實驗結果：**TGF- $\beta$ 1 有抑制牙髓細胞生長的趨勢，且 SB431542 可以逆轉這個趨勢，U0126 則無法逆轉，而 5z-7-oxozeanol 的加入使得細胞數目下降更多。TGF- $\beta$ 1 可以促進 PAI-1 和 uPAR 基因和蛋白的表現，uPA 的基因和蛋白表現則被抑制，collagen I 沒有顯著改變。SB431542、5z-7-oxozeanol 和 U0126 可以影響 TGF- $\beta$ 1 對 PAI-1/uPAR 的表現，uPA 則會受到 SB431542 和 5z-7-oxozeanol 影響。此外，TGF- $\beta$ 1 能活化 p-Smad2、p-Smad3、p-TAK1 和 p-ERK 等訊息活化。

**結論：**TGF- $\beta$ 1 對於牙髓細胞的訊息路徑調控是相當複雜的，透過 Smad (ALK5/Smad2/3) 和 Non-Smad (TAK1 及 MEK/ERK) 路徑，TGF- $\beta$ 1 可以調控 PAI-1/uPA/uPAR，影響 ECM 的堆積與重塑。本實驗結果對於牙髓細胞的修復有進

一步瞭解，期望在未來再生醫學方面的研究能有所幫助。



**關鍵字：**人類牙髓細胞、轉化生長因子- $\beta$ 1、尿激酶型纖維蛋白溶解酶原活化因子、  
尿激酶型纖維蛋白溶解酶原活化因子受體、纖維蛋白溶解酶原活化因子抑制劑第  
一型

## ABSTRACT



**Aim:** Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) plays a role in the repair and dentinogenesis of human dental pulp, including the deposition and remodeling of extracellular matrix (ECM). Plasminogen activation system regulates ECM degradation. However the relationship between TGF- $\beta$ 1 and plasminogen activation system is not fully clear. The purpose of this study was to investigate the effect of TGF- $\beta$ 1 on plasminogen activation system of human dental pulp cells and its related signaling pathways.

**Materials and methods:** Primary human dental pulp cells were treated with 0.5, 1, 5, 10, 25 ng/mL of TGF- $\beta$ 1. MTT assay, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), Western Blot and Immunofluorescence were used to detect the effect of TGF- $\beta$ 1 on cell viability and expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and collagen I at 24 hrs and 5 days. The activation of Smad2, TAK1, and ERK was also addressed. Besides, cells were pretreated with SB431542 (an ALK5/Smad2/3 inhibitor), 5z-7-oxozeaenol (a TAK1 inhibitor), U0126 (a MEK/ERK inhibitor) for examining the related signaling pathways.

**Results:** TGF- $\beta$ 1 slightly inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner, which could be reversed by SB431542 but not be reversed by U0126, and the cell number decreased more when adding 5z-7-oxozeaenol. TGF- $\beta$ 1 up-regulated PAI-1 and uPAR expression, whereas uPA was down-regulated and the changes of collagen I was not obvious. SB431542, 5z-7-oxozeaenol and U0126 generally could reverse the expression of TGF- $\beta$ 1 on PAI-1/uPAR; besides, SB431542 and 5z-7-oxozeaenol might have

influence on uPA expression. Furthermore, TGF- $\beta$ 1 induced the activation of p-Smad2, p-Smad3, p-TAK1, and p-ERK signaling.

**Conclusion:** The regulation of signaling pathway on TGF- $\beta$ 1-treated dental pulp cells is complicated. TGF- $\beta$ 1 can affect PAI-1/uPA/uPAR expression through Smad/ALK5 and Non-Smad (TAK1 and MEK/ERK) pathways and therefore affect the deposition and remodeling of ECM. These results give an aspect to understand the mechanism of pulpal repair, and can be helpful for further investigation of pulpo-dentin regeneration.

**Keywords:** human dental pulp cell, TGF- $\beta$ 1, PAI-1, uPA, uPAR

# 目錄



口試委員會審定書 .....	i
誌謝 .....	ii
中文摘要 .....	iii
ABSTRACT .....	v
目錄 .....	vii
縮寫表 .....	ix
第一章       導論 .....	1
1.1 牙髓-牙本質複合體 (dentin-pulp complex) .....	1
1.1.1 牙髓的修復機制 .....	1
1.1.2 生長轉化因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 與牙髓-牙本質複合體 .....	2
1.2 轉化生長因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ ) .....	3
1.2.1 TGF- $\beta$ 異型體與胜肽結構 .....	3
1.2.2 TGF- $\beta$ 受體 .....	4
1.2.3 TGF- $\beta$ 訊息傳遞 .....	4
1.3 細胞外基質 (extracellular matrix) .....	5
1.4 纖維蛋白溶解活化系統 (plasminogen activation system , PA system) .....	6
第二章       實驗目的與虛無假設 .....	8
第三章       材料與方法 .....	9
3.1 材料 .....	9
3.2 培養牙髓細胞 .....	10
3.3 藥物對牙髓細胞形態影響 (cell morphology) .....	10
3.4 細胞存活率分析 (MTT assay) (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) .....	11
3.5 反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction) (RT-PCR) .....	11
3.5.1 細胞的 RNA 萃取 .....	12
3.5.2 RNA 定量 .....	13



3.5.3 反轉錄 (reverse transcription , RT) .....	13
3.5.4 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction , PCR) .....	14
3.5.5 PCR 產物電泳分析 .....	14
3.6 西方墨點法 (western blot) .....	15
3.6.1 細胞的蛋白質萃取 .....	15
3.6.2 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) .....	15
3.6.3 蛋白質樣本的轉印 .....	17
3.6.4 免疫墨點法 (immune-blot) .....	17
3.7 免疫螢光法 (immunofluorescence) .....	18
3.8 統計 .....	19
第四章 結果 .....	20
4.1 細胞形態觀察 .....	20
4.2 TGF-β1 對細胞存活率的影響- MTT assay .....	20
4.3 TGF-β1 對 PAI-1/ uPA/ uPAR/ collagen I 的影響，以及抑制劑的調控 - RT-PCR & western blot .....	21
4.3.1 TGF-β1 處理 5 天& 24 小時 .....	21
4.3.2 加入 SB421542 、5z-7-oxozeanol 與 U0126 處理 5 天&24 小時 .....	21
4.4 TGF-β1 活化訊息路徑 - western blot & immunofluorescence .....	22
第五章 討論 .....	23
5.1 TGF-β1 對於細胞存活率的影響 .....	23
5.2 TGF-β1 對 PAI-1/ uPA/ uPAR 的影響 .....	24
5.3 TGF-β1 對 collagen I 的影響 .....	26
5.4 TGF-β1 對 Smad/non-Smad 訊息路徑的影響 .....	26
第六章 結論 .....	28
參考文獻 .....	29
附錄 .....	39

## 縮寫表



BMP	bone morphogenetic protein
ECM	extracellular matrix
ERK	extracellular signal-regulated kinases
I-Smad	inhibitory smad
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MMP	matrix metalloproteinase
MTA	mineral trioxide aggregate
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PA	plasminogen activator
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
Plg	plasminogen
R-Smad	receptor regulated smad
TAK1	transforming growth factor $\beta$ -activated kinase 1
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor- $\beta$ 1
T $\beta$ R	transforming growth factor- $\beta$ 1 receptor
tPA	tissue-type plasminogen activator
uPA	urokinase-type plasminogen activator
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor



# 第一章 導論

## 1.1 牙髓-牙本質複合體 (dentin-pulp complex)

牙髓-牙本質複合體在組織學和功能上被視為是互相影響的關係。牙齒發育時，來自神經脊 (neural crest) 的外胚層間葉細胞 (ectodermal mesenchymal cell) 接收到訊息，移動聚集到牙間乳頭 (dental papilla) 外層，最後前造牙本質母細胞 (pre-odontoblast) 排列到牙髓的外側，其中垂直基底膜的前造牙本質母細胞分化成造牙本質母細胞 (odontoblast)，細胞突伸入牙本質小管中，分泌原生牙本質 (primary dentin)；其餘未分化的前造牙本質母細胞成為造牙本質母細胞下層細胞 (cell of the sub-odontoblast layer) (Murray & Garcia-Godoy, 2004)。在牙齒萌發、牙根形成後，造牙本質母細胞仍會持續分泌生理性的繼生牙本質 (secondary dentin)，特別是在牙髓腔和牙髓腔底，所以在年長患者的牙齒常可見到牙髓腔內縮。

牙髓是個疏鬆的結締組織。成人牙髓中主要的細胞群是類纖維母細胞 (fibroblast-like cell)，其他還有血管細胞、神經細胞、外被細胞、巨噬細胞、淋巴細胞等等。類纖維母細胞分泌複雜的細胞外基質 (extracellular matrix，以下簡稱 ECM)，包含第一類膠原纖維 (56%) 及第三類膠原纖維 (41%)，和胎兒纖維結合素 (fibronectin)、骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein，以下簡稱 BMP)、基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase，以下簡稱 MMP) 等非膠原蛋白。相比之下，牙本質中只有造牙本質母細胞突，ECM 則複雜的多，第一類膠原纖維佔了 98%，非膠原蛋白方面，特色在於有磷酸化基質蛋白 (dentin sialophosphoprotein DSPP、dentin sialoprotein DSP、dentin phosphoprotein DPP、dentin matrix protein-1 DMP-1、bone sialoprotein BSP、和 osteopontin OPN)、非磷酸化基質蛋白、蛋白聚糖 (proteoglycans)、MMP、生長因子、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 等等 (Goldberg & Smith, 2004)。

### 1.1.1 牙髓的修復機制

當牙髓受到外在刺激，比如說蛀牙、鑽針修磨、磨耗、外傷等，牙髓會根據刺激的強弱有不同的反應。微弱、慢性的刺激，像蛀牙時細菌產生的酸，讓感染



區牙本質內儲藏的生長因子被釋放，調控感染區下方存活的造牙本質母細胞促進分泌反應性牙本質 (reactionary dentin) (Smith et al., 1995)。相較之下強烈的刺激，感染處下方造牙本質母細胞死亡後，若感染及發炎反應能得到控制，感染區的生長因子、生長激素和趨化因子會吸引造牙本質母細胞下層細胞、纖維母細胞、牙髓中心的未分化間葉細胞等前趨細胞，形成類造牙本質母細胞 (odontoblast-like cell)，並分泌修復性牙本質 (reparative dentin)，形成牙本質橋。反應性牙本質和修復性牙本質又稱第三級牙本質 (tertiary dentin) (Smith & Lesot, 2001)。

### 1.1.2 生長轉化因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 與牙髓-牙本質複合體

造牙本質母細胞分化以及牙本質生成時，造牙本質母細胞會分泌生長因子，而有些生長因子會被儲存在 ECM 中，等待受到刺激後再度被釋放 (Inage & Toda, 1996)。比如說，在健康的人類白齒中，造牙本質母細胞、造牙本質母細胞下層細胞、牙髓纖維母細胞都會表現不同程度的 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3 三種異型體，其中 TGF- $\beta$ 3 的表現最強；然而在蛀牙白齒中，TGF- $\beta$ 1 表現最強，且在第三級牙本質的表現比原生牙本質強 (Sloan et al., 2000)。TGF- $\beta$ 1 和 ECM 的核心蛋白聚糖 (decorin) 和雙糖鏈蛋白聚糖 (biglycan) 有很強的親和力，TGF- $\beta$ 3 則不具這項特性，這讓 TGF- $\beta$ 1 被分泌出來後能快速儲藏到 ECM 而不被代謝掉 (Baker et al., 2009; Cassidy et al., 1997)。

蛀牙細菌產生的酸、樹脂前處理的酸、乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid，以下簡稱 EDTA)、或臨床使用的覆髓材料例如氫氧化鈣或三氧礦化物 (Mineral Trioxide Aggregate，以下簡稱 MTA)，能溶解釋放 ECM 裡的生長因子和其他非膠原蛋白成分，讓這些分子參與調控類造牙本質母細胞和牙髓細胞的基因表現，修復牙本質和牙髓組織 (Tziaras et al., 2000)。此外，不可逆性牙髓炎 (irreversible pulpitis) 中造牙本質母細胞和造牙本質母細胞下層細胞的 TGF- $\beta$ 1 表現量比健康的牙髓來得高，代表 TGF- $\beta$ 1 參與了牙髓發炎後修復的過程 (Piattelli et al., 2004)。

由於 TGF- $\beta$ 1 在牙胚發育和牙本質生成中調控類造牙本質母細胞分化 (Tziaras et al., 1998)、促使造牙本質母細胞下層細胞和牙髓細胞的細胞增生、和促進 ECM



生成的角色 (Melin et al., 2000)，動物研究開始朝向在覆髓材料加入 TGF- $\beta$ 1 以期望促進癒合和軟硬組織再生。使用不同的材料作為載體，顯示 TGF- $\beta$ 1 可以促進修復性牙本質的生成，和牙髓的修復 (Hu et al., 1998; Li et al., 2014; Zhang et al., 2008)。

## 1.2 轉化生長因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )

TGF- $\beta$  是 TGF- $\beta$  家族的一員。這個家族可以簡單區分成：TGF- $\beta$  sub-family、decapentaplegic-Vg-related (DVR) sub-family (包含 BMP)、activins/inhibins sub-family 和其他遠親 (例如 Anti-Müllerian Hormone)，彼此擁有相似的序列、蛋白結構和訊息傳遞路徑 (Herpin et al., 2004)。TGF- $\beta$  家族是一個多功能的細胞激素，作用的細胞種類甚多，比如單核細胞、上皮細胞、神經細胞和間葉細胞；它掌控細胞生長、凋零、分化、趨化、移動、ECM 沈積等，進一步調控免疫反應、傷口癒合、血管新生和組織生長。TGF- $\beta$  在胚胎發育、維持組織自我平衡、調控生理過程等方面的影響，使得許多疾病與 TGF- $\beta$  訊息路徑受到干擾或過度刺激有關，比如癌症、自體免疫疾病，或發育缺陷 (Massagué, 1990)。

### 1.2.1 TGF- $\beta$ 異型體與勝肽結構

TGF- $\beta$  目前發現有 5 種異型體，其中人類和哺乳類動物細胞是表現 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3 (Herpin et al., 2004)。TGF- $\beta$  以前勝肽 (pro-peptide) 形式合成，到高基氏體 (Golgi apparatus) 形成二聚體 (dimeric mature peptide)，成熟的勝肽會和 Latency Associated Peptide (LAP) 形成非共價鍵結，變成 TGF- $\beta$ -LAP 複合體，或叫做 small latent complex (SLC)，然後再跟 latent TGF- $\beta$ -binding proteins (LTBPs) 結合，形成 TGF- $\beta$ -SLC-LTBP 或稱 large latent complex (LLC)，最終 TGF- $\beta$  以 LLC 的形式被分泌到細胞外 (Lafyatis, 2014)。LLC 無法跟 TGF- $\beta$  受體結合，是潛藏型 TGF- $\beta$  (latent form)，直到蛋白酶或是酸性環境才能切斷 LAP 和 LTBPs，露出活化型 TGF- $\beta$  (active form) 傳遞訊息 (Khalil, 1999)。



### 1.2.2 TGF- $\beta$ 受體

大多數細胞會表現 3 種 TGF- $\beta$  受體，分別第一類、第二類和第三類 (T $\beta$ RI、T $\beta$ RII、T $\beta$ RIII)。

第一類受體 (T $\beta$ RI，或稱 activin receptor-like kinase-5, ALK5) 和第二類受體 (T $\beta$ RII) 屬於跨膜型絲氨酸/蘇氨酸激酶受體 (transmembrane serine/threonine kinase receptor)，兩者會一起參與 TGF- $\beta$  的訊息傳遞 (Massagué, 1990)。TGF- $\beta$ 1 和 TGF- $\beta$ 3 對 T $\beta$ RII 有很高的親和性，彼此結合後會徵召並活化 T $\beta$ RI，往下開啟 Smad pathway (Connolly et al., 2012)。在大多數細胞，TGF- $\beta$  是經過 T $\beta$ RI/ALK5 傳遞訊息，但在內皮細胞，TGF- $\beta$  會和兩種不同的 T $\beta$ RI 結合，分別是 ALK1 和 ALK5，ALK5 往下活化 Smad2/3，而 ALK1 活化 Smad1/5，兩者對於內皮細胞的移動和增生有相反的影響 (Arany et al., 2007)。

第三類受體又叫 betaglycan，是一個膜錨定蛋白聚糖，它對 TGF- $\beta$  三種異型體都有親和性。T $\beta$ RIII 也有水溶型 (soluble form)，在血清和 ECM 中會發現少量的 T $\beta$ RIII。T $\beta$ RIII 通常作為一個共同受體，幫助結合 TGF- $\beta$  並呈現給 T $\beta$ RII (López-Casillas et al., 1993)。

### 1.2.3 TGF- $\beta$ 訊息傳遞

TGF- $\beta$  的訊息調控可以分成典型 Smad pathway 和 non-Smad pathway。首先，TGF- $\beta$  結合並活化 T $\beta$ RII，接著 T $\beta$ RI 上的 glycine- and serine-rich sequence (GS domain) 被 T $\beta$ RII 磷酸化，T $\beta$ RI 和 T $\beta$ RII 兩者結合形成複合體引發下游訊息路徑 (Franzén et al., 1995)。

在 Smad pathway，根據配體不同，T $\beta$ RI 會活化不同的 R-smad (receptor regulated smad)：TGF- $\beta$ /activin/nodal/myostatin 會活化 Smad2/3，BMP/GDF 會活化 Smad1/5/8。磷酸化的 R-smad 和 common signaling transducer Smad4 形成複合體進入細胞核，結合到 DNA 上調控基因表現。這條路徑會受到多樣的調控，比如細胞質內許多蛋白的磷酸化、核質運輸蛋白 (nucleocytoplasmic shuttling protein)、泛素 (ubiquitin) 調節蛋白水解，以及 inhibitory smad (I-smad) 6 和 7。I-smad 產生自 Smad 訊息傳遞，在細胞核中累積，在細胞接收到 TGF- $\beta$ /BMP 後釋放到細胞質，和 T $\beta$ RI 結合，

阻斷 R-smad 磷酸化或 R-smad-smad4 複合體，作為 TGF- $\beta$ /BMP 訊息傳遞的負向回饋 (Derynck & Zhang, 2003)。

TGF- $\beta$  和 BMP 也會經過 non-Smad pathway 來調控細胞活性。Non-Smad pathway 包含幾個分支，Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway、Rho-like GTPase signaling pathway，和 phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Akt pathway。MAPK pathway 家族主要包含以下 3 種：extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)、c-Jun-N-terminal kinases (JNK1/2/3)/stress-activated protein kinases (SAPKs)、和 p38 kinases (Yue & Mulder, 2000)。

TGF- $\beta$  MAPK pathway 和細胞凋亡有關，在上皮細胞和肝細胞的凋亡研究中，TGF- $\beta$  和 T $\beta$ RII 結合，活化 pro-apoptotic adaptor protein，往下游啟動 TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1)，透過 MAPK kinase MMK 4 磷酸化活化 JNK，或透過 MMK3/6 活化 p38，而促使細胞凋亡 (Hofmann et al., 2003)。

在人類牙髓中，TGF- $\beta$  可以活化 ERK1/2 和 p38 並影響 Smas2/3 訊息傳遞 (Wang et al., 2006)。Smad7 和 TAK1-p38 pathway 也會互相影響，在 TGF- $\beta$  誘發的細胞凋亡中，上游的 Smad7 會活化 TAK1-p38；TAK1-p38 也會增強 Smad7 的基因表現。這代表 Smad pathway 和 non-Smad pathway 彼此之間也會互相影響 (Edlund et al., 2003; Yanagisawa et al., 2001)。

### 1.3 細胞外基質 (extracellular matrix)

組織除了細胞，還有細胞之間的 ECM。ECM 主要由葡萄糖胺聚合醣 (glycosaminoglycans，或稱 GAG) 和纖維蛋白(包含膠原蛋白、彈性蛋白、胎兒纖維結合素和層黏連蛋白)，組成一個網絡結構，提供細胞支撐和生化訊息傳遞。在大多數結締組織，ECM 是由纖維母細胞分泌，而在特殊組織如骨頭或牙本質，則是由造骨母細胞或造牙本質母細胞分泌。膠原蛋白是 ECM 中主要的蛋白，其中第一類膠原蛋白是由兩條 pro- $\alpha$ 1 鏈和一條 pro- $\alpha$ 2 鏈組成三股繩索狀螺旋結構的前膠原蛋白 (pro-collagen)，被蛋白水解處理後釋放到細胞外，交聯成網 (Alberts et al., 2002)。以北方點墨法分析，牙髓細胞表現大量第一類膠原蛋白，且可以從轉譯層級調控 (Kuo et al., 1992)；免疫染色分析顯示牙髓細胞表現第一類膠原蛋白，但胎



兒纖維結合素很少或不表現 (Veron et al., 1990)。

文獻上對於 TGF- $\beta$  是否能刺激膠原蛋白形成有不同的結果。在小鼠皮下注射  $<0.1\mu\text{g}/\text{ml}$  TGF- $\beta$ 1，2 至 3 天內可以觀察到肉芽組織增生 (Roberts et al., 1986)；TGF- $\beta$  可以透過 Smad3 調控人類皮膚纖維母細胞的膠原蛋白基因表現 (Flanders, 2004)；本研究室先前研究發現，以  $1.0\text{ ng}/\text{ml}$  TGF- $\beta$ 1 培養牙髓細胞 5 天，可以觀察到膠原蛋白的增加 (Chan et al., 2005)；然而，培養的造牙本質母細胞或牙髓細胞在  $10\text{ ng}/\text{ml}$  TGF- $\beta$ 1 處理培養下，第一類膠原蛋白的產生量沒有明顯改變 (Palosaari et al., 2001)。

## 1.4 纖維蛋白溶解活化系統 (plasminogen activation system , PA system)

細胞透過膜表面的整合素 (integrin) 和 ECM 接觸，接收環境的力學或化學變化，因此 ECM 的重塑對於細胞存活、移動與增生有複雜的影響。ECM 會被蛋白酶 (protease) 降解，這包含 MMP 和纖維蛋白溶解活化系統 (plasminogen activation system , PA system) ，兩者在傷口癒合過程中交互作用。

PA 系統屬於絲氨酸蛋白酶 (serine protease)。和 ECM 降解有關的成員，包含 細維蛋白溶解酶原 (plasminogen，或簡稱 Plg)、組織型纖維蛋白溶解酶原活化因子 (tissue-type plasminogen activator，或簡稱 tPA)、尿激酶型纖維蛋白溶解酶原活化因子 (urokinase-type plasminogen activator，或簡稱 uPA)、尿激酶型纖維蛋白溶解酶原活化因子受體 (urokinase-type plasminogen activator receptor，或簡稱 uPAR)，和 細維蛋白溶解酶原活化因子抑制劑第一型 (plasminogen activator inhibitor-1 and-2，或簡稱 PAI-1)。

tPA 和 uPA 都是以單鏈結構分泌出來，被水解形成雙鏈結構，兩者都會將 Plg 水解成纖維蛋白溶解酶 (plasmin)。由於 tPA 對於纖維蛋白 (fibrin) 有很強親和力，目前被臨床運用在血栓溶解劑治療中風；uPA 則和 uPAR 結合，對細胞移動有所影響 (Allan & Martin, 1995)。uPAR 是膜蛋白，有三個功能區 D1-D3，被 GPI 錨定蛋白 (glycosyl phosphatidylinositol anchored-protein，GPI-anchored protein) 固定在細胞膜表面，也可被切斷 GPI 錨定蛋白釋放出來，成為可溶型 uPAR (suPAR)，這兩

種形態都可以和 uPA 以 D1 功能區結合 (Blasi & Carmeliet, 2002)。當細胞表現 uPAR，不活化的 uPA (pro-uPA) 和 uPAR 結合，形成活化 uPA，將 Plg 水解成纖維蛋白溶解酶，纖維蛋白溶解酶接著將不活化的 MMP (pro-MMP) 轉換成活化 MMP，纖維蛋白溶解酶和 MMP 一同降解 ECM，並活化潛藏型 TGF- $\beta$ ；纖維蛋白溶解酶還會回頭幫助活化 pro-uPA，形成一個 uPA 與纖維蛋白溶解酶互惠活化的現象 (Plesner et al., 1997)。

纖維蛋白溶解酶會被  $\alpha$ 2-抗纖維溶解酶 ( $\alpha$ 2-antiplasmin) 抑制，或在上游透過 PAI-1 抑制 uPA。PAI-1 是個單鏈蛋白折疊成三級蛋白，有兩個特殊功能區，一個會和 vitronectin 結合，進而錨定在 ECM；另一個功能區是反應圈 (reactive center loop, RCL) 即是抑制 tPA/uPA 活性的地方 (Lee & Huang, 2005)，此外 PAI-1 結合到 uPA-uPAR 複合體上，透過細胞內吞作用，將 PAI-1-uPA 降解，uPAR 回收到細胞表面 (Czekay et al., 2001)。透過以上方式，PAI-1 保護 ECM 蛋白不被降解，幫助傷口癒合。



## 第二章 實驗目的與虛無假設

傷口癒合是一個發炎與修復協調的過程，需要多種細胞、生長因子與 ECM 的重塑來達成。在各個階段有不同生長因子參與在內，而有暫時性的表現。其中，來自周遭血流的血小板、或從 ECM 活化的 TGF- $\beta$ 1 能調控 PA 系統，讓 PAI-1/uPA 相對活性的改變，使得 ECM 產生降解/堆積的動態變化，細胞因此得以移動至傷處，之後增生或分化 (Kutz et al., 2001)。牙髓受傷後，細胞接收到周遭 TGF- $\beta$ 1 的刺激，會如何調控 PA 系統進而影響 ECM，是令人好奇的，然而目前研究並不多，其作用機制尚未明朗，因此這是本篇研究想進一步探討的地方。

本篇研究目的是想探討：(1) TGF- $\beta$ 1 是否調控人類牙髓細胞之 PA 系統，進而影響 ECM 的重塑，以及 (2) TGF- $\beta$ 1 是否會經由 ALK5/Smad2/3 pathway 或 non-smad (MEK/ERK,TAK1) pathway 來調控 PA system。

虛無假設是 TGF- $\beta$ 1 對人類牙髓細胞的 PAI-1、uPA 或 uPAR 沒有任何影響，也不會活化 Smad/non-Smad 訊息路徑。

實驗設計方面：(1) 以 MTT assay 進行藥物處理 5 天後對細胞存活率的分析。接下來選擇藥物處理後 24 小時及 5 天兩個時間點，(2) 以 RT-PCR 檢測 PAI-1, uPA 和 uPAR 的基因表現，(3) 以 Western Blot 檢測 PAI-1, uPA 和 uPAR 的蛋白表現。訊息傳導路徑方面，則以 (4) Western Blot 及 (5) Immunofluorescence 檢測 p-Smad2, p-Smad3, p-ERK 和 p-TAK1 的表現。



## 第三章 材料與方法

### 3.1 材料

- (1) Recombinant TGF- $\beta$ 1 購自 PeproTech (PeproTech, Inc., NJ, USA)。
- (2) 培養液為 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) , Penicillin/streptomycin 購自 Gibco (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)。
- (3) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), 4-(5-benzol[1,3]dioxol-5-yl-4-pyrdin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)-benzamide hydrate (SB431542) and 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(o-aminophenyl mercapto) butadiene (U0126) 購自 Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)
- (4) (3S,5Z,8S,9S,11E)-3,4,9,10-tetrahydro-8,9,16-trihydroxy-14-methoxy-3-methyl-1H -2-benzoxacyclotetradecin-1,7(8H)-dione (5z-7-oxozeaenol) 購自 Tocris (Tocris Bioscience, Bristol, UK)
- (5) The SuperScript TM III First-Strand DNA synthesis system for RT-PCR 購自 Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)。
- (6) RNA isolation kit and NucleoSpin RNAII 購自 Macherey-Nagel (Macherey-Nagel Inc., Easton, PA, USA)。
- (7) 一級抗體 PAI-1, uPA, uPAR, p-TAK1 購自 GeneTex (GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA)；一級抗體 GAPDH, p-Smad 2/3, p-ERK, collagen I , Luminol 感應試劑購自 Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, U.S.A.)
- (8) 細胞溶解液 (lysis buffer) for RNA isolation 的成份如下：10 mM Tris (pH=7.0) , 140 mM NaCl , 3 mM MgCl<sub>2</sub> , 0.5% NP-40 , 2 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) , 1% aprotinin , 5 mM DTT (dithiothreitol) .
- (9) Blocking buffer for western blotting 的成份如下：25 g 脫脂奶粉 , 0.1g NaN<sub>3</sub> , 加入 1X TBST 至 500 mL , 保存於 4°C 的環境中。
- (10) 細胞溶解液 (Golden lysis buffer) for western blotting 的成份如下: 137 mM NaCl , 20 mM Tris (pH= 7.9) , 10 mM NaF , 5 mM EDTA , 1 mM EGTA , 10% (v/v) Glycerol , 1% (v/v) Triton X-100 , 1 mM Sodium orthovanadate , 1 mM Sodium



pyrophosphate，100 mM  $\beta$ -Glycerophosphate，加入 ddH<sub>2</sub>O 至 500 mL，保存於 4°C 的環境中。

(11) Protein Extraction Buffer (1mL) for western blotting 的成份如下：0.955 mL Gold lysis buffer，20  $\mu$ L PMSF (50 mM)，10  $\mu$ L Aprotinin (1 mg/mL)，10  $\mu$ L Leupeptin (1 mg/mL)，5  $\mu$ L DTT (1 M)。

### 3.2 培養牙髓細胞

- (1) 在台大醫院倫理委員會同意與患者同意簽名下，取得來自小於25歲病人，無齲齒或牙周病的健康小白齒或第三大白齒，共三顆。
- (2) 拔後立即敲碎，取出牙髓組織，用無菌的DMEM清洗兩遍，再用無菌的手術刀切成約一立方公分大小碎片，將其放在10 cm dish中 (Corning Industries, Corning, NY)，加入適量含10% FBS，100 $\mu$ g/ml streptomycin，100U/ml penicillin 的DMEM培養。
- (3) 7至14天後，於相位差顯微鏡 (IX-71, Olympus INC.,USA) 於100倍下觀察長到7-8分滿時可分盤。先去除上清液，利用PBS wash (5 ml/dish)，接著吸除PBS，加入1倍的trypsin/ EDTA (1 ml/dish)。
- (4) 放入於37 °C，5% 二氧化碳，潮濕環境的培養箱中置放5分鐘。
- (5) 取出培養皿後，輕拍以拍下仍附著的細胞後，加入4 ml 的medium (含10% DMEM)，以1:3的比例，混和均勻後分盤 (3盤)。本研究所用的牙髓細胞為第3~8代 (Chang *et al.*, 1998)。

### 3.3 藥物對牙髓細胞形態影響 (cell morphology)

- (1) 在 24-well culture plate 的每格中鋪上  $1 \times 10^5$  個牙髓細胞於含 10% FBS 的 DMEM 培養液。
- (2) 於 37°C, 5% 二氧化碳，潮濕環境的培養箱中培養 24 小時。更換新的含 10% FBS 的 DMEM 培養液。



- (3) 分別加入不同濃度的 TGF-β1 (Control, 0.5, 1, 5, 10, 25 ng/ml)，以及抑制劑：SB431542 (1, 2.5 μM), U0126 (1, 10 μM), 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5 μM)。
- (4) 於加藥 5 天後使用相位差顯微鏡於 100 倍下觀察牙髓細胞外形變化並照相。

### 3.4 細胞存活率分析 (MTT assay) (3-(4,

#### **5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)**

- (1) 在 24-well plate 的每格中鋪上  $1 \times 10^5$  個牙髓細胞於 10% FBS 的 DMEM 培養液。
- (2) 24 小時後換新的含 10% FBS 的 DMEM 培養液。
- (3) 加入不同濃度的 TGF-β1 (Control, 0.5, 1, 5, 10, 25 ng/ml) 以及抑制劑: SB431542 (1, 2.5 μM), U0126 (1, 10 μM), 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5 μM)。
- (4) 於 37°C，5% 二氧化碳，潮濕環境的培養箱中培養 5 天。
- (5) 加入 MTT (0.5 mg/ml)，放入培養箱中作用 2 小時。
- (6) 吸除含 MTT 之培養液，加入 300 μL 二甲基亞砜 (DMSO; Dimethyl sulfoxide;  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ )，使其混合溶解甲臘(formazan;  $\text{CN}_4\text{H}_5$ )。
- (7) 各取上述培養皿中液體 100 μL 到 96-well plate 中。
- (8) 使用 ELISA reader (Multiskan Spectrum, USA)，於 540 nm 波長下測量其 OD 值。

結果以下列公式呈現:  $[(\text{樣本讀值}-\text{背景讀值})/(\text{對照組讀值}-\text{背景讀值})] \times 100\%$

### 3.5 反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction) (RT-PCR)

#### ❖ 使用的 primer sequence

Primer	Sense sequence	Anti-sense sequence	Base pair
β-actin	5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCCT-3'	5'-TACATGGCTGGGTGTTGAA-3'	218bp

(ref: Kumar et al., 2009)

PAI-1	5'-ATGGGATTCAAGATTGATGA-3'	5'-TCAGTATAAGTTGAACCTTGTT-3'	425bp
(ref: Ishikawa et al., 1996)			
uPA	5'-ATGCCCGATTCAAGAAGAGGA-3'	5'- GACAGGCAGTGAGTGGCACT-3'	169bp
(ref: De Petro et al., 1998)			
uPAR	5'-GCCCTCCTCTCCTCCAGAAGAA-3'	5'-GTAGACGATGTAGTCCTCCTTC-3'	246bp
(ref: Sato et al., 2015)			
Collagen IaI	5'-CCCTCCTCTCCTCCAGAAGAA-3'	5'-GTAGACGATGTAGTCCTCCTTC-3'	310bp
(ref: De Blasio et al., 2005)			

### 3.5.1 細胞的 RNA 萃取

- (1) 在 10 公分 culture dish 上鋪  $1.5 \times 10^6$  個牙髓細胞於 10 mL 培養液，隔天換新的含 10% FBS 的 DMEM 培養液，之後加入不同濃度的 TGF-β1 (Control, 0.5, 1, 5, 10, 25 ng/mL) 以及抑制劑：SB431542 (1, 2.5 μM), U0126 (1, 10 μM), 5z-7-oxozeanenol (1, 2.5 μM)，培養 24 小時或 5 天。
- (2) 吸除培養液後，以磷酸鹽緩衝鹽水 (phosphate-buffered saline; PBS) 清洗後，加入 350 μL RA1 (lysis buffer, guanidine thiocyanate) 和 3.5 μL β-mercaptoethanol 到培養盤中，用無菌刮勺將細胞刮下，將黏稠液吸至 NucleoSpin Filter unit (Macherey-Nagel INC., Germany)，放到紫色收集管 (filtration column) 中，以 14000 r.p.m. (Z 233 MK-2, HermLe INC., Germany) 離心 1 分鐘，收取濾液。目的是將蛋白質，細胞壁等阻擋在膜上，收集濾液 cell lysate。
- (3) 在濾液中加入 350 μL 70% 酒精，並用 pipette 混合使得濾液均質化。
- (4) 組合 NucleoSpin RNA column 和 2 mL 的離心管，將濾液吸入容器 (column) 上層中，以 10000 r.p.m. 離心 30 秒，去除液體。
- (5) 組合 NucleoSpin column 放入一個新的無菌收集管中 (Silica column)，加入 350 μL 的 MDB (Membrane Desalting Buffer, guanidine thiocyanate <10%)，以 14000 r.p.m. 離心 1 分鐘，去除液體。
- (6) 準備 DNase reaction mixture：以 10 μL DNase 加入 90 μL DNase reaction buffer



混合。

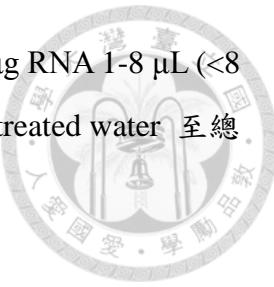
- (7) 將 95  $\mu$ L DNase reaction mixture 放入結合 NecleoSpin RNA column 之離心管中，靜置使其反應 15 分鐘。
- (8) 加入 200  $\mu$ L RA2 (DNase stop solution 和 wash buffer, guanidine thiocyanate) 到 NecleoSpin column，以 10000 r.p.m. 離心 30 秒，去除液體。
- (9) 加入 600  $\mu$ L RA3 (wash buffer) 到 NecleoSpin column，以 10000 r.p.m. 離心 30 秒後去除上清液。
- (10) 倒掉濾液，再加入 250  $\mu$ L RA3 (wash buffer) 到 NecleoSpin column 以 14000 r.p.m. 離心 2 分鐘，再將 column 放到 1.5 mL nuclease-free 的離心管中。
- (11) 最後將 60  $\mu$ L RNase -free water 均勻加入 column 中，以 14000 r.p.m. 離心一分鐘，留取濾液，內含取得之 RNA，儲存在-20°C 環境備用。

### 3.5.2 RNA 定量

- (1) 將裝有 DEPC-treated H<sub>2</sub>O 50 mL Tube 自-4°C 環境中取出。
- (2) 將欲定量之 RNA 自-4°C 環境中取出，置於冰浴中，待溫度降至室溫後離心。
- (3) 取 1000  $\mu$ L DEPC-treated H<sub>2</sub>O 和 10  $\mu$ L 欲定量之 RNA 置入 1.5 mL eppendorf 中混合。
- (4) 將 RNA+DEPC-treated H<sub>2</sub>O 的溶液以分光光度計 (Spectrophotometer, Hitachi, U-2001)，測出 RNA 在 280 nm 和 260 nm 的吸光值。
- (5) 所抽到的 RNA 濃度 ( $\mu$ g/ml)為： $OD_{260} \times 40 \times$  稀釋倍數 ( $\mu$ g) (即 1 mL 的 DEPC-treated H<sub>2</sub>O/加入 10  $\mu$ L RNA；若 260 nm 的 OD 值為 1，則表示 1 mL RNA 溶液含有 40  $\mu$ g 的 RNA。)(將抽到的 RNA 測量其 260 nm/280 nm 吸光值之比值；若比值大於 1.8 表示所抽到的 RNA 純度夠)

### 3.5.3 反轉錄 (reverse transcription, RT)

使用的是 Invitrogen SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (adapted from Life Technologies Corporation)。



- (1) 在 0.2 mL eppendorf 中配製 RNA/primer mixture, 配法如下: 5 µg RNA 1-8 µL (<8 µL), 1 µL dNTP 10 mM, Oligo (dT) (0.5 µg/µl), 加入 DEPC-treated water 至總體積 10 µL。
- (2) 放在 65°C 中處理 5 分鐘，然後置於冰上至少 1 分鐘。
- (3) 加入 10X RT buffer 2 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 µL, 0.1 M DTT 2 µL, RNase inhibitor 1 µL，在 25 °C 下處理 2 分鐘。
- (4) 接著加入 1 µL Superscript III RT (Invitrogen, USA) 放在 25 °C 中處理 2 分鐘、42°C 中處理 50 分鐘，然後在 70 °C 處理 15 分鐘後中止反應，並置於冰上。
- (5) 加入 1 µL E.coli RNase H (2 U/ µL, Invitrogen)，放在 37°C 中處理 20 分鐘即得 cDNA。

### 3.5.4 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction , PCR)

- (1) 於總體積 50 µL 的混合反應液中分別含有 2 µL 的 first-stand cDNA, 5 µL 的 10 倍 PCR buffer, 2 單位 Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA), 1 µL 各種欲測定之 primer, 200 µmol 的 deoxynucleotide triphosphate (dNTP)。混合均勻後置入溫度循環器 (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 thermal cycler, using the GenePrint STR System LPL (8p22) of Promega Corporation, Madison, WI, USA.)。
- (2) 聚合酶連鎖反應的溫度先以 94°C, 2 分鐘來分開雙股(denaturation), 而後為 20-35 個溫度循環反應，其中每個循環依序為:
  - i. 94 °C, 30 秒分開雙股螺旋
  - ii. 55 °C, 1 分鐘的連結 (annealing)
  - iii. 72 °C, 30 秒的延伸(extension)經不同溫度循環反應後，整個反應溶液最後保持在 72°C 的延伸溫度下 10 分鐘。取出 PCR 產物置放在冰上 5 分鐘。

### 3.5.5 PCR 產物電泳分析

- (1) 秤取 4.5 g agarose，倒入含 250 mL 1xTBE buffer 之燒瓶中，加保鮮膜後以微波

爐加熱至完全透明，加入 30  $\mu$ L 的溴乙稀 (ethidium bromide, 10  $\mu$ g/mL)，倒入製膠槽並插上齒梳，等待 40 分到一小時至膠體完全冷卻轉為乳白色後，置入冰箱下層 30 分鐘以上。

- (2) PCR 產物加入 2  $\mu$ L loading dye (PROTECH, 6 X Loading Buffer) 混合均勻，取 12 $\mu$ L 加入膠體樣品格 (well) 中；取 4  $\mu$ L DNA ladder (Bio-100 TM Mass DNA Ladder) 加入膠體 well，以 135V 電壓跑電泳。
- (3) 電泳完畢後，膠體置於紫外光 (UV light) 下觀察，並以 Alpha Image (Alpha Innotech Corporation#210125) 照相記錄。

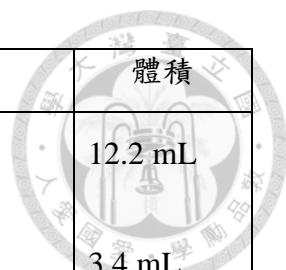
### 3.6 西方墨點法 (western blot)

#### 3.6.1 細胞的蛋白質萃取

- (1) 在 10 公分 culture dish 上鋪  $1.5 \times 10^6$  個牙髓細胞於 5 mL 培養液，隔天換新的含 10% FBS 的 DMEM 培養液，之後分別再加入不同濃度的 TGF- $\beta$ 1 (Control, 0.5, 1, 5, 10, 25 ng/mL)，以及抑制劑：SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M), U0126 (1, 10  $\mu$ M), 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5  $\mu$ M)。培養 24 小時或 5 天後，去除 DMEM 培養液，再以 PBS 清洗兩次 (於冰浴環境中完成，以減少對蛋白質的傷害)。
- (2) 加入約 150  $\mu$ L lysis buffer，並用塑膠刮勺將細胞刮下後用 pipette 吸至 1.5 mL eppendorf tube 中，使用震盪器 (Vortex Genie2, Scientific Industries Inc., USA) 震盪之，然後置於冰浴 20 分鐘，每 10 分鐘震盪一次。
- (3) 以 12000 r.p.m. (Z 233 MK-2, HermLe INC., Germany) 離心 30 分鐘，並以蛋白質濃度測定試劑組 (Amresco Inc. , USA) 來測量 cell lysate 上層 (supernatant) 蛋白質濃度。
- (4) 以每管含 40  $\mu$ g 蛋白質的濃度分裝至 eppendorf tube 中，保存於-20°C 環境中。

#### 3.6.2 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)

##### ❖ SDS-PAGE 膠體配方



10% 分離膠 (resolving gel) 成分	體積
去離子水 (ddH <sub>2</sub> O)	12.2 mL
3M 三羥甲基氨基甲烷鹽酸鹽緩衝液 (pH8.9) (Tris (hydroxymethyl) aminomethane; Tris-HCl)	3.4 mL
40% 丙烯醯胺 (Acrylamide)	5 mL
10% 十二烷基硫酸鈉聚丙烯 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS)	200 μL
10% 過硫酸銨 (Ammonium persulfate; APS)	200 μL
四甲基乙二胺 (Tetramethylethylenediamine; TEMED)	15 μL
成層膠 (Stacking gel) 成分	體積
去離子水(ddH <sub>2</sub> O)	7.87 mL
3M 三羥甲基氨基甲烷鹽酸鹽緩衝液 (pH6.8) (Tris(hydroxymethyl)aminomethane; Tris-HCl)	1.25 mL
40% 丙烯醯胺 (Acrylamide)	1 mL
10% 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS)	100 μL
10% 過硫酸銨 (Ammonium persulfate; APS)	100 μL
四甲基乙二胺 (Tetramethylethylenediamine; TEMED)	20 μL

### (1) 製膠方法：

將電泳片裝置在電泳槽 (BioRad) 上 (電泳片上層為 stacking gel，下層為 resolving gel)，在電泳膠片製作完成後，並填滿電泳緩衝液。將分裝於 0.5 mL eppendorf tube 的蛋白質樣本加入與樣本體積 1:1 的 SDS/protein loading dye，使用乾浴器 (Fire Fox Dry Bath 6100, 汎泰) 於 100°C 環境加熱 5 分鐘後，離心 spin down 再以冰浴冷卻。將所處理之 40 ug/ul 蛋白質樣本置入各個 well 中；樣本右方 well 加入 5 μL protein ladder (PageRuler Prestained Protein Ladder)，樣本左方 well 加入 1.5 μL protein ladder，以 80-120 mA 的電流量進行電泳分離。



### 3.6.3 蛋白質樣本的轉印

#### (1) 試劑與材料

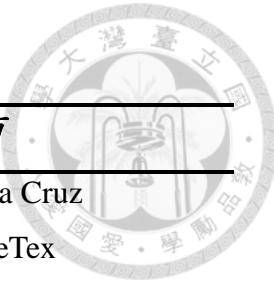
- i. 電泳轉印槽 (electrotransfer tank; SCIE-PLAS , UK)
- ii. 電源供應器 (PowerPac Basic; Biorad, USA)
- iii. 轉漬紙 (3M paper)
- iv. 電泳轉印緩衝液 (electrotransfer buffer)
- v. 轉漬膜 (Hybond-PVDF transfer membrane; Perkin Elmer, Canada)

#### (2) 方法：

剪一張 Hybond-PVDF transfer membrane，以甲醇 (methanol) 浸濕活化 1 分鐘以去除其極性，連同兩張 3M paper 放入 transfer buffer (內含 20 mM Tris-HCl, 150 mM Glycine, 20% Methanol, pH=8.3) 中浸濕。操作時，堆疊的順序由下而上依次為海綿、3M paper、Hybond-PVDF transfer membrane、SDS-PAGE gel、3M paper、海綿，再放入轉漬槽中，以 400 mA 的電流量轉漬 2.5 小時。

### 3.6.4 免疫墨點法 (immune-blot)

- (1) 轉印完成後，PVDF transfer membrane 以 5% milk blocking buffer (含 5% 牛奶的 TBST) 室溫下作用 1 小時。
- (2) 將前述之牛奶液置換為相關之一級抗體 (primary antibody)；於室溫下震盪作用兩小時或放入冰箱 overnight。
- (3) 以 TBST (Tris-base 0.607 g、NaCl 2.92 g、TWeen 20 0.5 mL 加二次水至 500 mL，pH 7.5) 緩衝液清洗四次，每次 5 分鐘。
- (4) 加入與一級抗體對應之 1:5000 的二級抗體 (HRP-labeled anti-goat、anti-mouse、anti-rabbit secondary antibody)，室溫下震盪作用 45 分鐘。
- (5) 以 TBST 緩衝液清洗四次，每次 5 分鐘。
- (6) 最後加入 Luminol 感應試劑 (enhanced chemiluminescence reagents；Santa cruz Biotechnology, USA) 作用 40 秒。
- (7) 在呈色機 (LAS-4000, Fujifilm, Japan) 上以適當時間顯影。



#### ❖ 使用的一級抗體

抗體	比例	型號	廠商
GAPDH	1:4000	Sc-32233	Santa Cruz
PAI-1	1:2000	GTX100550	GeneTex
uPA	1:2000	GTX100465	GeneTex
uPAR	1:2000	GTX100467	GeneTex
COL1A1 (L-19)	1:500	Sc-8783	Santa Cruz
p-TAK1 (p-MAP3K7)	1:2000	GTX62938	GeneTex
p-ERK	1:500	Sc-7383	Santa Cruz
p-Smad2	1:2000	3101	Cell Signaling
p-Smad3	1:2000	Sc-130218	Santa Cruz

### 3.7 免疫螢光法 (immunofluorescence)

- (1) 在 24-well plate 的每格中舖上  $5 \times 10^4$  個牙髓細胞於 10 % FBS 的 DMEM 培養液。  
培養 24 小時後換新培養液。
- (2) 加入 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TGF- $\beta$ 1 刺激 0、5、10、30、60 分鐘，對照組不加藥。
- (3) 吸乾液體，以 PBS wash 一次。
- (4) 每 well 加入 1 mL 4% paraformaldehyde (PBS in 1xPBS) 固定，輕拍 plate 晃動，  
靜置室溫下反應 20 分鐘。
- (5) 吸乾 4% PFA，以 PBS wash 三次。
- (6) 每 well 加入 1 mL 2% PBST 使細胞 permeabilize，室溫下靜置反應 20 分鐘。
- (7) 等待時間可配製 250  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  於 25 mL PBS，及 0.5 g BSA 於 10mL PBS，  
震盪混合均勻。
- (8) 吸乾 PBST。
- (9) 每 well 加入 1 mL 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( 250  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in 25 mL PBS )，靜置反應 20 分鐘。
- (10) 吸乾液體，以 PBS wash 三次。
- (11) 每 well 加入 300  $\mu\text{L}$  5% BSA blocking solution (0.5 g BSA in 10mL PBS)，室溫  
下靜置反應 1 小時。



- (12) 等待時配製一級抗體：75 $\mu$ L 2% PBST (0.1%) + 300 $\mu$ L 5% BSA (1%) + 1125 $\mu$ L PBS。加入 7.5  $\mu$ L 一級抗體 (200 倍稀釋)。
- (13) 每 well 加入 295  $\mu$ L 一抗，確認一抗有均勻覆蓋 cover slides 且沒有氣泡殘留。蓋上蓋子，室溫下反應 overnight。
- 隔天--
- (14) 吸乾一抗，以 PBS wash 三次。
- (15) 配製與一級抗體相對應的二級抗體：20 $\mu$ L 二抗於 1.98mL PBS (100 倍稀釋)
- (16) 每 well 加入 300 $\mu$ L 二抗，確認二抗有均勻覆蓋 cover slides 且沒有氣泡殘留，室溫下避光反應 1.5 至 2 小時。
- (17) 吸乾二抗，以 PBS wash 三次。
- (18) 配製 7.5 $\mu$ L DAPI 於 7.5mL PBS (1000 倍稀釋)，每 well 加入 300 $\mu$ L，確認 DAPI 有均勻覆蓋 cover slides 且沒有氣泡殘留，室溫下避光反應 30 分鐘。
- (19) 吸乾 DAPI，以 PBS wash 五次。
- (20) 吸乾 PBS。
- (21) 以水溶性膠封片 (確認無氣泡)，滴一滴在載玻片上。
- (22) 用探針勾起 cover slide 再以鑷子夾取，細胞面朝下蓋於封片膠上，將多餘的封片膠輕輕壓出，確認無氣泡殘留。
- (23) 放置 4°C 保存 (最多保存 3 個月)。
- (24) 在螢光顯微鏡下觀察。

### 3.8 統計

每組樣本數至少為三，且實驗項目至少重複三次。實驗數據以 One-way ANOVA 以及 post hoc Tukey's test，SPSS 8.0 統計軟體做分析。P 值小於 0.05 視為組別間的存在有顯著差異。



## 第四章 結果

### 4.1 細胞形態觀察

牙髓細胞是紡錘型，具有長長的細胞突觸。在光學顯微鏡下觀察，加入 TGF- $\beta$ 1 的牙髓細胞與對照組相比，沒有形態上的明顯變化，也沒有明顯細胞間空隙增加（圖 1）。加入 SB421542、5z-7-oxozeaenol 以及 U0126 三種抑制劑，在常用且不具毒性濃度下，對於細胞形態和細胞密度沒有明顯影響（圖 2、圖 3）。

### 4.2 TGF- $\beta$ 1 對細胞存活率的影響- MTT assay

根據 MTT 分析，加入 TGF- $\beta$ 1 (0.1-10 ng/ml) 會看到細胞數目隨著濃度上升有下降的趨勢，且在濃度為 5 及 10 ng/ml 時達到統計上的顯著差異，代表高濃度 (5, 10 ng/ml) TGF- $\beta$ 1 對於牙髓細胞數目有負向調控（圖 4）。在加入 ALK5/Smad2/3 抑制劑 - SB431542 處理的組別，發現單純只加 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 對於細胞數目沒有明顯改變；另外 TGF- $\beta$ 1 對細胞存活率的影響，有被 SB431542 (2.5  $\mu$ M) 反轉的趨勢，且達到統計差異（圖 5）。表示 TGF- $\beta$ 1 可能透過 ALK5/Smad2/3 訊息路徑調控細胞數目。

除了 Smad pathway，另外還加入了兩種 non-Smad pathway 抑制劑。5z-7-oxozeaenol 是 MAPK 訊息路徑上游 TAK1 抑制劑，它本身對於細胞數目沒有明顯影響，然而 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5  $\mu$ M) 無法逆轉 TGF- $\beta$ 1 對細胞存活率的負調控，甚至細胞數目下降更多，達到統計差異（圖 6）；U0126 是 MEK/ERK 1/2 的抑制劑，藥物本身對細胞數目沒有影響，且 TGF- $\beta$ 1 的作用有被 U0126 (1, 10  $\mu$ M) 逆轉的趨勢，然而沒有達到統計差異（圖 7）。代表 TGF- $\beta$ 1 無法透過 TAK1 及 MEK/ERK 兩條訊息路徑影響細胞數目。



## 4.3 TGF- $\beta$ 1 對 PAI-1/ uPA/ uPAR/ collagen I 的影響，以及抑制劑的調控 - RT-PCR & western blot

### 4.3.1 TGF- $\beta$ 1 處理 5 天& 24 小時

加入不同濃度的 TGF- $\beta$ 1 5 天後，從 RT-PCR 結果可以觀察到 PAI-1 和 uPAR 的 mRNA 表現量上升，uPA 表現量下降，collagen I 則沒有明顯改變（圖 8A.）。從 WB 可以觀察到與 RT-PCR 一樣的趨勢，PAI-1 和 uPAR 的蛋白表現量上升，特別是在濃度 10 & 25 ng/ml 有明顯提升；uPA 表現量下降，特別是在濃度 10 & 25 ng/ml 有明顯變化；collagen I 則沒有明顯改變（圖 8B.）。

同樣的條件在 24 小時候觀察，RT-PCR 方面 PAI-1 和 uPAR 的表現量上升，uPA 表現量下降，collagen I 沒有明顯改變（圖 9 A.）。WB 方面，PAI-1、uPAR、uPA 和 collagen I 的改變和 RT-PCR 相似（圖 9B.）。表示不管在 24 小時或 5 天，加入 TGF- $\beta$ 1 可以促進 PAI-1 和 uPAR 的表現，以及抑制 uPA 的表現，對 collagen I 則沒有明顯影響。

### 4.3.2 加入 SB421542、5z-7-oxozeaenol 與 U0126 處理 5 天&24 小時

加入 SB431542，5 天的 RT-PCR 可以看到 PAI-1、uPAR 和 collagen I 的表現受到 SB431542 (2.5 $\mu$ M) 抑制；而 uPA 在 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 的逆轉下表現量上升（圖 10A.）。WB 的部分 PAI-1 和 uPAR 因為高濃度 SB431542 (2.5 $\mu$ M) 抑制而下降，uPA 在高濃度 SB431542 (2.5 $\mu$ M) 逆轉下表現量上升，collagen I 沒有受到抑制劑影響（圖 10B.）。在 24 小時部分，PAI-1 和 uPAR 表現量受到 SB431542 (2.5  $\mu$ M) 影響而下降，uPA 在 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 的逆轉下表現量上升，collagen I 表現量沒有受到抑制劑影響（圖 11A.）。在 WB 可以觀察到，uPAR 蛋白受到 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 的作用而下降，uPA 蛋白表現在高濃度 SB431542 (2.5 $\mu$ M) 作用下回升；PAI-1 和 collagen I 則不受影響（圖 11B.）。整體來看，PAI-1、uPAR、uPA 和 collagen I 在兩個時間點都有受到 SB431542 這個 ALK5/Smad2/3 抑制劑的影響，代表 TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml 可能透過 Smad 路徑影響 PAI-1、uPAR 和 uPA。

Non-Smad 路徑方面，首先加入 5z-7-oxozeaenol，5 天發現 PAI-1、uPAR、uPA

和 collagen I mRNA 表現量沒有受到抑制劑影響 (圖 12A.)，然而 PAI-1 和 uPAR 的蛋白表現量會受到 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5 $\mu$ M) 的影響下降，uPA 在 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5 $\mu$ M) 影響下表現量逆轉上升，Collagen I 的蛋白表現量沒有改變 (圖 12B.)。24 小時部分，PAI-1、uPAR、uPA 和 collagen I 不管是 mRNA 或蛋白表現都沒有受到抑制劑作用 (圖 13A.B.)。從 5 天蛋白表現量的改變推測，TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml 會透過 TAK1 路徑影響 PAI-1、uPAR 和 uPA。

最後是 U0126，加藥刺激 5 天，PAI-1、uPAR、uPA 和 collagen I 四者的 mRNA 表現沒有受到抑制劑的影響而變化 (圖 14A.)，然而 PAI-1 的蛋白表現會受到 U0126 (1, 10  $\mu$ M) 影響而下降，uPAR、uPA 和 collagen I 則沒有受到抑制劑影響 (圖 14B.)。在 24 小時的觀察，PAI-1、uPAR、uPA 和 collagen I 的 mRNA 變化和 5 天一致，沒有受到抑制劑影響 (圖 15A.)，但 uPAR 會因 U0126 (1, 10  $\mu$ M) 影響而蛋白表現下降，PAI-1、uPA 和 collagen I 表現量沒有受到抑制劑影響 (圖 15B.)。由於 5 天時 PAI-1 蛋白表現的改變，還有 24 小時時 uPAR 蛋白表現的改變，推測 TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml 可經由 MEK/ERK 路徑影響 PAI-1 和 uPAR。

#### 4.4 TGF- $\beta$ 1 活化訊息路徑 - western blot & immunofluorescence

另外還檢測牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 0.5, 1, 5, 10, 25 ng/ml 觀察 24 小時，以及加入 TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml 觀察 0-40 分鐘，訊息路徑的活化。首先 24 小時觀察到 p-TAK1 在濃度 0.5-5 ng/ml 時有明顯上升，之後在 10-25 ng/ml 下降；p-Smad2 在濃度 5-25 ng/ml 有明顯上升；p-ERK 則是 0.1-0.5 ng/ml 時上升，0.5 ng/ml 下降一點，10-25 ng/ml 又再度上升 (圖 16A.)。加入 TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml 觀察 0-40 分鐘，p-Smad3 在 20 分鐘有明顯表現，p-ERK 則在 5-10 分鐘有明顯表現。代表 TGF- $\beta$ 1 可能會活化 ALK5/Smad2/3、TAK1 以及 MEK/ERK 三條路徑。

免疫螢光部分，加入 TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml，在 0-60 分鐘的時間點觀察，發現從 30 分鐘到 60 分鐘，牙髓細胞細胞核會表現 p-Smad3，表示 TGF- $\beta$ 1 可能會活化 Smad 這條路徑 (圖 17)。



## 第五章 討論

### 5.1 TGF- $\beta$ 1 對於細胞存活率的影響

儲存在牙本質 ECM 的 TGF- $\beta$ 1，從人類牙冠部牙本質測量約為 166.7 pg/mg fraction (Cassidy et al., 1997)，而從兔子下頸前牙牙本質中觀察到 TGF- $\beta$ 1 有一半是以 active form 形式存在 (Smith et al., 1998)。然而一般生長激素會快速被周遭組織吸收分解，在 24 小時後就難以偵測，將 TGF- $\beta$ 1 注射到大鼠血管，發現 active form 半衰期只有 2 到 3 分鐘 (Wakefield et al., 1990)。文獻中處理的 TGF- $\beta$ 1 濃度差異很大，而有研究指出 TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) 可以誘導人類牙髓細胞 p-Smad2、p-Smad3、p-p38 和 p-ERK 的活化 (Wang et al., 2006)，因此本次研究選取 TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) 來進行研究。

TGF- $\beta$  對於細胞生長的影響，在文獻裡有相反的結果。本研究室過去發現，TGF- $\beta$ 1 0.5-10 ng/ml 會抑制人類牙髓細胞數目約 23-30%，TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3 也有相似的影響 (Chan et al., 2005)；小牛牙髓細胞以 TGF- $\beta$  5 ng/ml 培養 24 小時後，會抑制 DNA 生成約 30% (Nakashima, 1992)；大鼠牙髓細胞株 (RPC-C2A) 分別在 30% 滿盤及接近滿盤時加入不同濃度的 TGF- $\beta$  處理 2 天，發現 30% 滿盤時 TGF- $\beta$  對 DNA 生成沒有顯著影響，然而在接近滿盤的細胞數目時，會隨著 TGF- $\beta$  濃度上升而下降，在高濃度 TGF- $\beta$  (10 ng/ml) 有抑制細胞 DNA 生成的趨勢 (Liang et al., 1990)。然而，也有研究指出，人類牙髓細胞以低濃度 TGF- $\beta$  (3 ng/ml) 培養 1 天，會促進 DNA 生成 (Shiba et al., 1998)。在培養的人類臼齒切片中，由牙本質滴入 TGF- $\beta$  (20 ng/ml) 後 4 天觀察，造牙本質母細胞下層細胞和牙髓纖維母細胞數目都有增加 (Melin et al., 2000)。推測牙髓細胞對於 TGF- $\beta$ 1 的生長反應，可能跟細胞表現型 (phenotype)、受體表現之異同、TGF- $\beta$ 1 的濃度、或是培養環境的不同 (比如培養液中加入維他命 C、在加藥前 24 小時換低濃度 FBS 等)、活體實驗或細胞實驗有關。

MTT assay 是透過粒線體的琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase, SDH)，將黃色 MTT 還原成紫色 MTT formazan，當越多的 MTT formazan 產生，代表 SDH 活性高，細胞健康情形良好，因此所得數值之大小與細胞存活率成正比。根據 MTT



結果，高濃度 TGF- $\beta$ 1 有抑制細胞數目的趨勢 (5-10 ng/ml)。此外，TGF- $\beta$ 1 對細胞的影響有被 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 逆轉的趨勢，卻不會被 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5  $\mu$ M) 以及 U0126 (1, 10  $\mu$ M) 逆轉，推測 TGF- $\beta$ 1 對於牙髓細胞存活數目的調控，是透過 ALK5/Smad2/3 訊息路徑來達成。

## 5.2 TGF- $\beta$ 1 對 PAI-1/ uPA/ uPAR 的影響

TGF- $\beta$ 1 誘發許多基因表現，PAI-1 屬於其中相當顯著的一個，許多器官裡過度表現的 TGF- $\beta$ 1 透過 PAI-1 來產生組織纖維化。在人類血管平滑肌細胞的研究中，TGF- $\beta$ 1 能透過 Smad2/3 結合到 PAI-1 啟動子上 E box，配合 epidermal growth factor receptor (EGFR)-MEK/ERK 以及 RhoA/ROCK 兩條 non-Smad 路徑，共同調控 PAI-1 基因表現 (Samarakoon et al., 2011)；在小鼠單側輸尿管阻塞的研究模型中，觀察 7 天發現 p-Smad2/3 與 PAI-1 蛋白表現都有明顯上升 (Samarakoon et al., 2012)。

和 PAI-1 相似，uPA 在不同種類細胞會受 TGF- $\beta$ 1 的調控。健康牙齦組織中的纖維母細胞以 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 處理 48 小時，以酪蛋白酶譜法 (casein-zymography) 檢測培養液，發現 uPA 的表現受到抑制、或不表現 uPA，然而在肉芽組織中的纖維母細胞，則會表現與 TGF- $\beta$ 1 濃度正相關的 uPA，這被視為在受傷後癒合時，活化的纖維母細胞會透過生長因子調控 uPA；TGF- $\beta$ 1 刺激牙齦肉芽組織纖維母細胞分泌 uPA，而這會被 JNK 抑制劑阻斷，但 ERK 或 p-38 抑制劑無法達到作用，代表 JNK 這條路徑參與調控 uPA (Smith & Martínez, 2006)；在正常以及癌化皮膚細胞，TGF- $\beta$  透過 ERK1 MAPK signaling、JNK pathway 和 Smad3 可以刺激 uPA 生成 (Santibanez, 2013)。TGF- $\beta$ 1 在肌肉衛星細胞中能促進 PAI-1 和 uPAR 表現並抑制 uPA 生成 (Fibbi et al., 2002)。然而在大鼠類造骨母細胞中，TGF- $\beta$ 1 會抑制 PA 的活性，促進 PAI-1 和 uPA mRNA 表現，對 tPA mRNA 則沒有影響 (Allan et al., 1991)；在人類的角化細胞中，TGF- $\beta$ 1 也會促進 PAI-1 和 uPA mRNA 表現，以及促進細胞分泌 uPA (Keski-Oja & Koli, 1992)。這表示不同細胞的 PA 系統對 TGF- $\beta$ 1 之反應存在差異。

uPAR 在癌細胞研究很多，然而在正常組織中，uPAR 表現量並不多。ECM 重

塑時會表現 uPAR，在小鼠的皮膚傷口邊緣可以觀察到呈現 uPAR 的角化細胞，其 mRNA 量也有提升，然而周遭正常的上皮則沒有這些現象，代表表現 uPAR 的角化細胞正進行局部的 ECM 蛋白水解並移動 (Rømer et al., 1994; Solberg et al., 2001)。此外。TGF- $\beta$  可以在 5-10 分鐘內活化 JNK 路徑，並表現 uPAR 蛋白，表示 TGF- $\beta$  透過活化 T $\beta$ RII-JNK 這條 non-Smad 路徑來促進 uPAR 表現 (Yue et al., 2004)。

從 RT-PCR 和 WB 的結果，可以歸納 TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) 會促進牙髓細胞的 PAI-1 和 uPAR 表現，抑制 uPA 的表現。SB431542 (ALK5/Smad2/3 抑制劑)、5z-7-oxozeaenol (TAK1 抑制劑) 和 U0126 (MEK/ERK 1/2 抑制劑) 會抑制 TGF- $\beta$ 1 對 PAI-1/uPAR 的影響，B431542 和 5z-7-oxozeaenol 會逆轉 TGF- $\beta$ 1 對 uPA 的影響，猜測 TGF- $\beta$ 1 會透過 Smad 和 non-Smad 路徑來調控三者的表現。

PAI-1 是分子量 45kDa 的單鏈醣蛋白，屬於絲胺酸蛋白酶抑制劑 (serine protease inhibitor, SERPIN) 家族一員，這家族的特色在於擁有反應圈 (RCL) 功能區與 PA 作用，此外，活化型容易結構轉換成潛藏型，將 RCL 折入蛋白板中成為穩定的狀態 (Lee & Huang, 2005)。活化型和 PA 作用後，RCL 被切斷，成為裂解型，在一篇使用人類白血球彈性蛋白酶 (neutrophil elastase) 處理 PAI-1 的研究中，發現 PAI-1 被人類白血球彈性蛋白酶切斷後，形成一個較低分子量 (40kDa) 的結構，被認為是 PAI-1 的裂解型 (Wu et al., 1995)。在本次研究 WB 中，可以觀察到 PAI-1 有上下兩條 band，推測上條 band 為活化/潛藏型 PAI-1，下層為裂解型 PAI-1。

uPAR 經過轉譯後修飾，接上 GPI-anchored protein 後分子量約為 55-60 kDa，也是一個高糖化蛋白，若去糖化後勝肽鏈約只有 35 kDa (Behrendt et al., 1990)；此外它容易被蛋白酶從 D1-D 功能區之間切斷，包含生理情況下會有的酵素如白血球彈性蛋白酶、纖維蛋白溶解酶和 uPA，形成全長的 suPAR (55kDa) 和 D2D3 片段 (35kDa) 的混和物 (Sidenius et al., 2000)。它的目標 uPA，一般是以不活化的單鏈 pro-uPA (54kDa) 被分泌出來，之後水解成為活化的高分子量 uPA (high molecular weight uPA, HMW-uPA) (48kDa) 和 uPAR 結合。HMW-uPA 有可能從 A 鏈裂解成一段比較小的 A 鏈，形成無法和 uPAR 結合、具有蛋白水解能力的低分子量 uPA (low molecular weight uPA, LMW-uPA) (Brunner et al., 1990; Novokhatny et al., 1992)。從上述研究嘗試解釋 WB 的結果，推測 uPAR 出現兩條 band，上層可能是全長 suPAR，

下層裂解的 D2D3 片段；而 uPA 的兩條 band，上層是 pro-uPA，下層是 HMW-uPA。



### 5.3 TGF- $\beta$ 1 對 collagen I 的影響

Collagen I 在不同時間點和不同濃度處理下，表現並不穩定。這和一些研究結果相反 (Lin et al., 2011; Melin et al., 2000; Sloan & Smith, 1999)。推測可能跟實驗設計有關，例如使用含血清的培養液，可能會受到當中未知的賀爾蒙、生長因子、養分和蛋白質的影響，使細胞培養結果不一致，進而使實驗結果不穩定 (Barnes & Sato, 1980)。除了 FBS 濃度，鋪細胞的數量也會影響細胞的增生或分化 (Eslaminejad et al., 2010)；此外，有研究指出，收細胞溶解物 (cell lysate) 檢測不出 collagen，但收培養液 (medium supernatant) 則可以檢測 collagen 的改變 (Ziyadeh et al., 1994)。TGF- $\beta$  同時也調控 MMP/TIMP，也許使得 collagen 表現量沒有明顯改變。

### 5.4 TGF- $\beta$ 1 對 Smad/non-Smad 訊息路徑的影響

人類牙髓細胞和造牙本質母細胞會表現第一類和第二類 TGF- $\beta$  受器 (T $\beta$ RI/T $\beta$ RII) (Smith et al., 1998)，然而受器的表現會隨時間變化，在牛的牙髓細胞中，ALK5 (T $\beta$ RI) 在培養第 14 天會下降，到 21 天再回升，T $\beta$ RII 則是穩定表現 (Toyono et al., 1997)。其他研究表示，Smad3 表現量在 24 小時後會急速下降 (Bao et al., 2003)；加入 TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL) 的人類牙髓細胞，會在 5 分鐘表現磷酸化的 ERK1/2，在 45 分鐘表現磷酸化的 Smad2, Smad3 和 p38。推測牙髓細胞在不同時間點會透過不同配體和受器的結合，p-ERK (5-10 分鐘)、p-Smad2 (20 分鐘) 和 p-Smad3 (30-60 分鐘) 在不同的時間點達到表現高峰，來調控細胞的增生與分化。

此外，TGF- $\beta$ 1 濃度高低也會影響目標物的表現，例如低濃度 TGF- $\beta$ 1 (0.1-1 ng/ml) 會增加 ALPase 活性，然而在高濃度 TGF- $\beta$ 1 (>5 ng/ml) 會降低 ALPase (Shirakawa et al., 1994)；TGF- $\beta$ 1 (1-2 ng/ml) 會促進腎臟上皮細胞的移動，但在低濃度 (0.2-0.6 ng/ml) 却沒有影響，而高濃度 (5 ng/ml) 則會抑制細胞移動 (Kutz et al.,



2001)。本研究室林柏萱醫師結果，在人類牙髓細胞給予 TGF- $\beta$ 1 (5-10 ng/ml) 發現 ALP 活性下降，結果類似。這些現象也許可以解釋在 24 小時，低濃度 TGF- $\beta$ 1 (0.5-5 ng/ml) 會活化 p-TAK1，高濃度 TGF- $\beta$ 1 (10-25 ng/ml) 則是活化 p-ERK 和 p-Smad2 (TGF- $\beta$ 1 5-25 ng/ml)。

免疫螢光法主要想觀察磷酸化蛋白由細胞質進入細胞核的過程。研究指出，在 TGF- $\beta$ 1 處理下，細胞質的 Smad2/3 螢光密度會減少，而轉移到細胞核 (Bao et al., 2003; He et al., 2004)。本研究結果發現加入 TGF- $\beta$ 1 30-60 分鐘，牙髓細胞的細胞核表現 p-Smad3，然而傳統螢光顯微鏡的景深較深，無法確定磷酸蛋白是在細胞核內或疊到細胞核上造成的誤判，將來可以考慮使用共軛焦顯微鏡，並切兩個不同平面，取得淺景深且清晰的影像作確認。



## 第六章 結論

本篇研究結果拒絕了虛無假設，因為：

- (1) TGF- $\beta$ 1 會影響人類牙髓細胞之 PA 系統。透過促進 PAI-1 和 uPAR 的表現，和抑制 uPA 的表現，使得 ECM 重塑，對於傷口癒合時細胞的移動和細胞外環境的穩定有所影響（圖 18）。
- (2) TGF- $\beta$ 1 會活化 p-Smad2、p-Smad3、p-ERK 和 p-TAK1 等 Smad 和 non-Smad 訊息路徑。
- (3) TGF- $\beta$ 1 可能透過 ALK5/Smad2/3、TAK1 和 MEK/ERK 三種路徑來調控 PAI-1/uPAR 的表現；可能透過 ALK5/Smad2/3 和 TAK1 兩條路徑來調控 uPA 的表現。
- (4) TGF- $\beta$ 1 有抑制牙髓細胞數目的趨勢，且效果與濃度成正比。這也許代表在含血清、高密度細胞培養下，加入 TGF- $\beta$ 1 會讓細胞走向分化。
- (5) TGF- $\beta$ 1 可能透過 ALK5/Smad2/3 來調控細胞數目。
- (6) TGF- $\beta$ 1 對 collagen I 的影響在本研究結果沒有一致性，未來可以考慮培養細胞的密度降低，且將培養液的血清濃度階段性的降低至 0.5-2%，再進行探討，或許能得到較為一致的結果。

本篇研究的臨床意義，在透過 TGF- $\beta$ 1 對人類牙髓細胞的 PA 系統的調控，來進一步瞭解牙髓修復的機制，並希望對於未來牙髓-牙本質再生醫學的研究有所幫助。



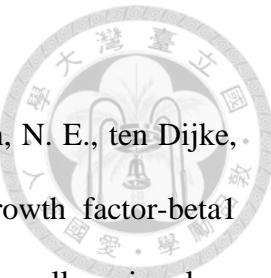
## 參考文獻

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). The extracellular matrix of animals.
- Allan, E. H., & Martin, T. J. (1995). The plasminogen activator inhibitor system in bone cell function. *Clin Orthop Relat Res.*(313), 54-63.
- Allan, E. H., Zeheb, R., Gelehrter, T. D., Heaton, J. H., Fukumoto, S., Yee, J. A., & Martin, T. J. (1991). Transforming growth factor beta inhibits plasminogen activator (PA) activity and stimulates production of urokinase-type PA, PA inhibitor-1 mRNA, and protein in rat osteoblast-like cells. *J Cell Physiol*, 149(1), 34-43.
- Arany, P. R., Nayak, R. S., Hallikerimath, S., Limaye, A. M., Kale, A. D., & Kondaiah, P. (2007). Activation of latent TGF-beta1 by low-power laser in vitro correlates with increased TGF-beta1 levels in laser-enhanced oral wound healing. *Wound Repair Regen*, 15(6), 866-874.
- Baker, S. M., Sugars, R. V., Wendel, M., Smith, A. J., Waddington, R. J., Cooper, P. R., & Sloan, A. J. (2009). TGF-beta/extracellular matrix interactions in dentin matrix: a role in regulating sequestration and protection of bioactivity. *Calcif Tissue Int*, 85(1), 66-74.
- Bao, L., Niu, Z., & Wang, P. (2003). The roles of Smad 2/3 in transforming growth factor-beta 1 signaling in human dental pulp cells. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi= Zhonghua kouqiang yixue zazhi= Chinese journal of stomatology*, 38(1), 39-42.
- Barnes, D., & Sato, G. (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell*, 22(3),



649-655.

- Behrendt, N., Rønne, E., Ploug, M., Petri, T., Løber, D., Nielsen, L.S., Schleuning, W.D., Blasi, F., Appella, E Danø, K. (1990). The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence and glycosylation variants. *Journal of Biological Chemistry*, 265(11), 6453-6460.
- Blasi, F., & Carmeliet, P. (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(12), 932-943.
- Brunner, G., Simon, M. M., & Kramer, M. D. (1990). Activation of pro-urokinase by the human T cell-associated serine proteinase HuTSP-1. *FEBS letters*, 260(1), 141-144.
- Cassidy, N., Fahey, M., Prime, S. S., & Smith, A. J. (1997). Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol.*, 42(3), 219-223.
- Chan, C. P., Lan, W. H., Chang, M. C., Chen, Y. J., Lan, W. C., Chang, H. H., & Jeng, J. H. (2005). Effects of TGF-beta s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol*, 50(5), 469-479.
- Connolly, E. C., Freimuth, J., & Akhurst, R. J. (2012). Complexities of TGF-beta targeted cancer therapy. *Int J Biol Sci*, 8(7), 964-978.
- Czekay, R. P., Kuemmel, T. A., Orlando, R. A., & Farquhar, M. G. (2001). Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol Cell.*, 12(5), 1467-1479.
- Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways



- in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature.*, 425(6958), 577-584.
- Edlund, S., Bu, S., Schuster, N., Aspenstrom, P., Heuchel, R., Heldin, N. E., ten Dijke, P., Heldin, C. H., Landstrom, M. (2003). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Mol Biol Cell*, 14(2), 529-544.
- Eslaminejad, M. B., Vahabi, S., Shariati, M., & Nazarian, H. (2010). In vitro growth and characterization of stem cells from human dental pulp of deciduous versus permanent teeth. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*, 7(4), 185.
- Fibbi, G., DAlessio, S., Pucci, M., Cerletti, M., & Rosso, M. D. (2002). Growth factor-dependent proliferation and invasion of muscle satellite cells require the cell-associated fibrinolytic system. *Biological chemistry*, 383(1), 127-136.
- Flanders, K. C. (2004). Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol.*, 85(2), 47-64.
- Franzén, P., Heldin, C. H., & Miyazono, K. (1995). The GS domain of the transforming growth factor-beta type I receptor is important in signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun.*, 207(2), 682-689.
- Goldberg, M., & Smith, A. J. (2004). Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(1), 13-27.
- He, W.-X., Niu, Z.-Y., Zhao, S.-L., Jin, W.-L., Gao, J., & Smith, A. J. (2004). TGF- $\beta$  activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol*, 49(11), 911-918.
- Herpin, A., Lelong, C., & Favre, I. P. (2004). Transforming growth factor- $\beta$ -related

proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans.

*Developmental & Comparative Immunology*, 28(5), 461-485.

Hofmann, T. G., Stollberg, N., Schmitz, M. L., & Wil, I. H. (2003). HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Res.*, 63(23), 8271-8277.

Hu, C. C., Zhang, C., Qian, Q., & Tatum, N. B. (1998). Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod.*, 24(11), 744-751.

Inage, T., & Toda, Y. (1996). Gene expression of TGF- $\beta$ 1 and elaboration of extracellular matrix using in situ hybridization and EM radioautography during dentinogenesis. *The Anatomical Record*, 245(2), 250-266.

Keski-Oja, J., & Koli, K. (1992). Enhanced production of plasminogen activator activity in human and murine keratinocytes by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Journal of investigative dermatology*, 99(2), 193-200.

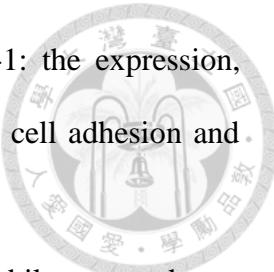
Khalil, N. (1999). TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect.*, 1(15), 1255-1263.

Kuo, M. Y., Lan, W. H., Lin, S. K., Tsai, K. S., & Hahn, L. J. (1992). Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol.*, 37(11), 945-952.

Kutz, S. M., Hordines, J., McKeown-Longo, P. J., & Higgins, P. J. (2001). TGF-beta1-induced PAI-1 gene expression requires MEK activity and cell-to-substrate adhesion. *J Cell Sci.* 3905-14.

López-Casillas, F., Wrana, J. L., & Massagué, J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell.*, 73(7), 1435-1444.

Lafyatis, R. (2014). Transforming growth factor beta--at the centre of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*, 10(12), 706-719.



- Lee, C.C., & Huang, T.S. (2005). Plasminogen activator inhibitor-1: the expression, biological functions, and effects on tumorigenesis and tumor cell adhesion and migration. *Journal of cancer molecules*, 1(1), 25-36.
- Li, F., Liu, X., Zhao, S., Wu, H., & Xu, H. H. (2014). Porous chitosan bilayer membrane containing TGF-beta1 loaded microspheres for pulp capping and reparative dentin formation in a dog model. *Dent Mater*, 30(2), 172-181.
- Liang, R.F., Nishimura, S., Maruyama, S., Hanazawa, S., Kitano, S., & Sato, S. (1990). Effects of transforming growth factor- $\beta$  and epidermal growth factor on clonal rat pulp cells. *Arch Oral Biol*, 35(1), 7-11.
- Lin, P. S., Chang, M. C., Chan, C. P., Lee, S. Y., Lee, J. J., Tsai, Y. L., Tseng, H.C., Tai, T.F., Lin, H.J., Jeng, J. H. (2011). Transforming growth factor beta1 down-regulates Runx-2 and alkaline phosphatase activity of human dental pulp cells via ALK5/Smad2/3 signaling. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 111(3), 394-400.
- Massagué, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*, 6, 597-641.
- Melin, M., Joffre-Romeas, A., Farges, J. C., Couble, M. L., Magloire, H., & Bleicher, F. (2000). Effects of TGF $\beta$ 1 on Dental Pulp Cells in Cultured Human Tooth Slices. *J Dent Res*, 79(9), 1689-1689.
- Murray, P. E., & Garcia-Godoy, F. (2004). Stem Cell Responses in Tooth Regeneration. *Stem Cells Dev*, 13(3), 255-262.
- Nakashima, M. (1992). The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. *Arch Oral Biol*, 37(3), 231-236.

Novokhatny, V., Medved, L., Mazar, A., Marcotte, P., Henkin, J., & Ingham, K. (1992).

Domain structure and interactions of recombinant urokinase-type plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry*, 267(6), 3878-3885.

Palosaari, H., Tasanen, K., Risteli, J., Larmas, M., Salo, T., & Tjäderhane, L. (2001).

Baseline expression and effect of TGF- $\beta$ 1 on Type I and III collagen mRNA and protein synthesis in human odontoblasts and pulp cellsIn Vitro. *Calcif Tissue Int*, 68(2), 122-129.

Piattelli, A., Rubini, C., Fioroni, M., Tripodi, D., & Strocchi, R. (2004 ). TGF-beta 1 expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis. *Int Endod J.*, 37(2), 114-119.

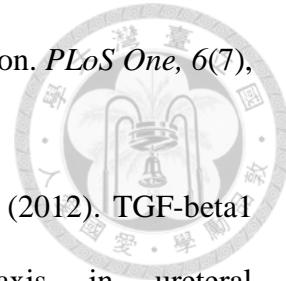
Plesner, T., Behrendt, N., & Ploug, M. (1997). Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells*, 15(6), 398-408.

Rømer, J., Lund, L. R., Eriksen, J., Pyke, C., Kristensen, P., & Danø, K. (1994). The receptor for urokinase-type plasminogen activator is expressed by keratinocytes at the leading edge during re-epithelialization of mouse skin wounds. *Journal of investigative dermatology*, 102(4), 519-522.

Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K., Smith, J. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H., Fauci, A. S. (1986). Transforming growth factor type beta rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 83(12), 4167-4171.

Samarakoon, R., Chitnis, S. S., Higgins, S. P., Higgins, C. E., Krepinsky, J. C., & Higgins, P. J. (2011). Redox-induced Src kinase and caveolin-1 signaling in

TGF-beta1-initiated SMAD2/3 activation and PAI-1 expression. *PLoS One*, 6(7), e22896.



Samarakoon, R., Overstreet, J. M., Higgins, S. P., & Higgins, P. J. (2012). TGF-beta1 --> SMAD/p53/USF2 --> PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Cell Tissue Res*, 347(1), 117-128.

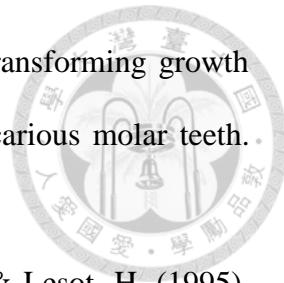
Santibanez, J. F. (2013). Transforming growth factor-Beta and urokinase-type plasminogen activator: dangerous partners in tumorigenesis—implications in skin cancer. *ISRN Dermatol*, 2013.

Shiba, H., Fujita, T., Nakamura, S., Nakanishi, K., Takemoto, T., Hino, T., Noshiro, M., Kawamoto, T., Kurihara, H., Kato, Y. (1998). Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secrated protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol*, 174(2), 194-205.

Shirakawa, M., Shiba, H., Nakanishi, K., Ogawa, T., Okamoto, H., Nakashima, K., Noshiro, M., Kato, Y. (1994). Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J Dent Res*, 73(9), 1509-1514.

Sidenius, N., Sier, C. F., & Blasi, F. (2000). Shedding and cleavage of the urokinase receptor (uPAR): identification and characterisation of uPAR fragments in vitro and in vivo. *FEBS letters*, 475(1), 52-56.

Sloan, A., & Smith, A. (1999). Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- $\beta$  isoforms 1–3 in vitro. *Arch Oral Biol*, 44(2), 149-156.



- Sloan, A. J., Perry, H., Matthews, J. B., & Smith, A. J. (2000). Transforming growth factor- $\beta$  isoform expression in mature human healthy and carious molar teeth. *The Histochemical Journal*, 32(4), 247-252.
- Smith, A. J., Cassidy, N., Perry, H., Bègue-Kirn, C., Ruch, J. V., & Lesot, H. (1995). Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*, 39(1), 273-280.
- Smith, A. J., & Lesot, H. (2001). Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*, 12(5), 425-437.
- Smith, A. J., Matthews, J. B., & Hal, R. C. (1998). Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in dentine matrix. *European Journal of Oral Sciences*, 106(s1), 179-184.
- Smith, P. C., & Martínez, J. (2006). Differential uPA expression by TGF-beta1 in gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 85(2), 150-155.
- Solberg, H., Ploug, M., Høyer-Hansen, G., Nielsen, B. S., & Lund, L. R. (2001). The murine receptor for urokinase-type plasminogen activator is primarily expressed in tissues actively undergoing remodeling. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(2), 237-246.
- Toyono, T., Nakashima, M., Kuhara, S., & Akamine, A. (1997). Temporal changes in expression of transforming growth factor- $\beta$  superfamily members and their receptors during bovine preodontoblast differentiation in vitro. *Arch Oral Biol*, 42(7), 481-488.
- Tziaras, D., Alvanou, A., Papadimitriou, S., Gasic, J., & Komnenou, A. (1998). Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor-beta 1 on dog dental pulp cells in vivo. *Arch Oral*

*Biol.*, 43(6), 431-444.

Tziaras, D., Smith, A. J., & Lesot, H. (2000). Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.*, 28(2), 77-92.

Veron, M. H., Couble, M. L., Caillot, G., Hartmann, D. J., & Magloire, H. (1990). Expression of fibronectin and type I collagen by human dental pulp cells and gingiva fibroblasts grown on fibronectin substrate. *Arch Oral Biol.*, 35(7), 565-569.

Wakefield, L. M., Winokur, T. S., Hollands, R. S., Christopherson, K., Levinson, A. D., & Sporn, M. B. (1990). Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution. *J Clin Invest.*, 86(6), 1976-1984.

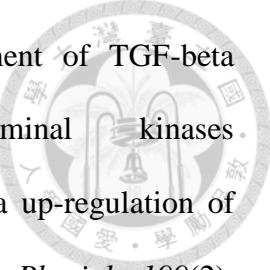
Wang, F. M., Hu, T., Tan, H., & Zhou, X. D. (2006). p38 Mitogen-activated protein kinase affects transforming growth factor-beta/Smad signaling in human dental pulp cells. *Mol Cell Biochem*, 291(1-2), 49-54.

Wu, K., Urano, T., Ihara, H., Takada, Y., Fujie, M., Shikimori, M., Hashimoto, K., Takada, A. (1995). The cleavage and inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by neutrophil elastase: the evaluation of its physiologic relevance in fibrinolysis. *Blood*, 86(3), 1056-1061.

Yanagisawa, M., Nakashima, K., Takeda, K., Ochiai, W., Takizawa, T., Ueno, M., Takizawa, M., Shibuya, H., Taga, T. (2001). Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7. *Genes Cells*, 6(12), 1091-1099.

Yue, J., & Mulder, K. M. (2000). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol Biol.*, 142, 125-131.



Yue, J., Sun, B., Liu, G., & Mulder, K. M. (2004). Requirement of TGF-beta receptor-dependent activation of c-Jun N-terminal kinases (JNKs)/stress-activated protein kinases (Saps) for TGF-beta up-regulation of the urokinase-type plasminogen activator receptor. *J Cell Physiol*, 199(2), 284-292.

Zhang, W., Walboomers, X. F., & Jansen, J. A. (2008). The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta1. *J Biomed Mater Res A*, 85(2), 439-444.

Ziyadeh, F. N., Sharma, K., Ericksen, M., & Wolf, G. (1994). Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *Journal of Clinical Investigation*, 93(2), 536.



## 附錄

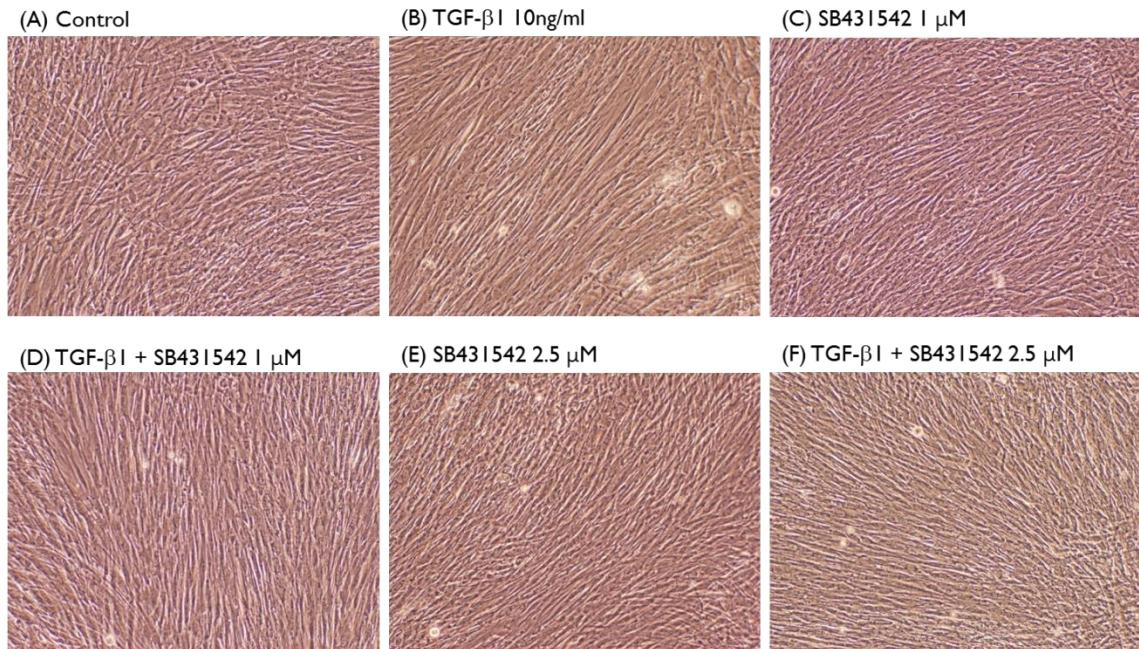


圖 1：牙髓細胞加入 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 以及 TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) 培養 5 天的形態觀察 (100x)。牙髓細胞為紡錘狀，類似纖維母細胞形態的細胞。不管是加入 TGF- $\beta$ 1 或高低濃度的 SB431542，對於細胞形態都沒有明顯改變。

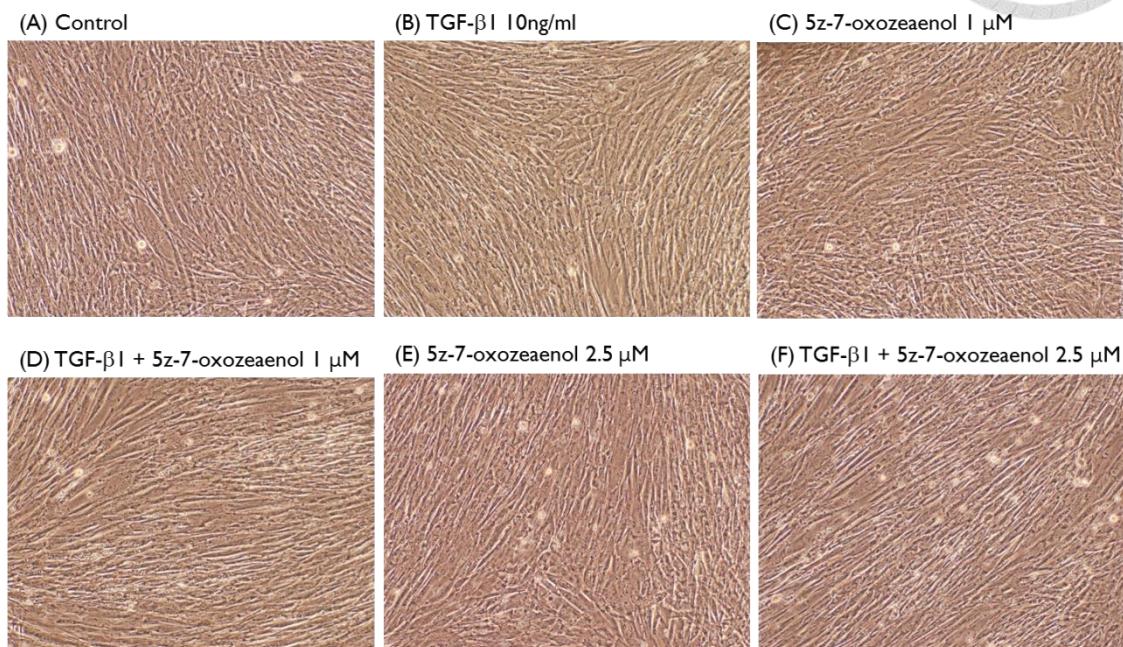


圖 2：牙髓細胞加入 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5  $\mu$ M) 以及 TGF- $\beta$ 1(10 ng/ml) 培養 5 天的形態觀察 (100x)。細胞形態在加入 TGF- $\beta$ 1 或高低濃度的 5z-7-oxozeaenol 都沒有明顯改變。

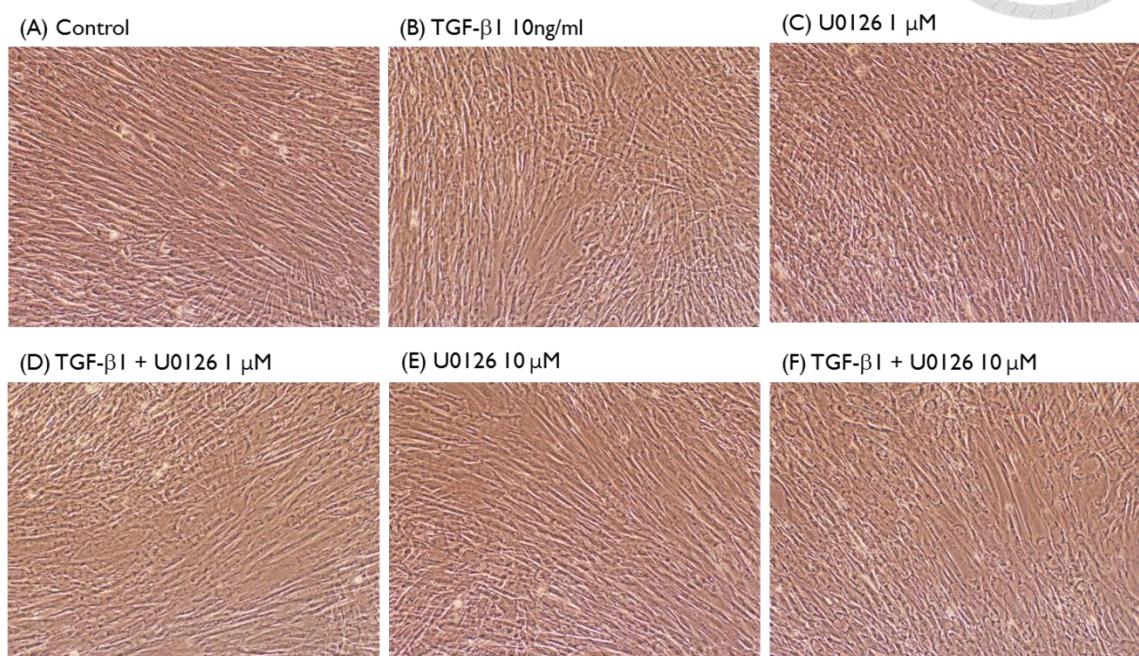


圖 3：牙髓細胞加入 U0126 (1, 10  $\mu$ M) 以及 TGF- $\beta$ 1(10 ng/ml) 培養 5 天的形態觀察 (100x)。細胞形態在加入 TGF- $\beta$ 1 或高低濃度的 U0126 都沒有明顯改變。

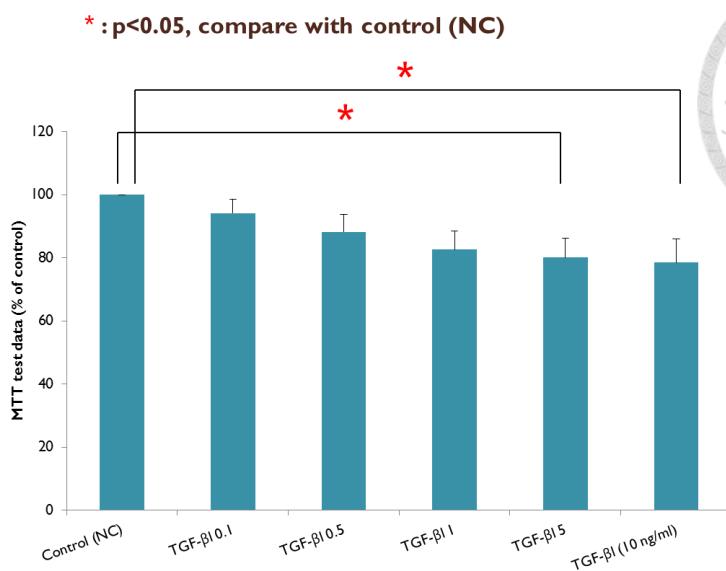


圖 4：MTT：牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ng/ml 觀察 5 天 (n=10)。加入不同濃度的 TGF- $\beta$ 1 培養 5 天，細胞數目隨著濃度上升有下降的趨勢，且在 TGF- $\beta$ 1 濃度 5-10 ng/ml 時有統計差異。

\*: 與對照組相比，p<0.05

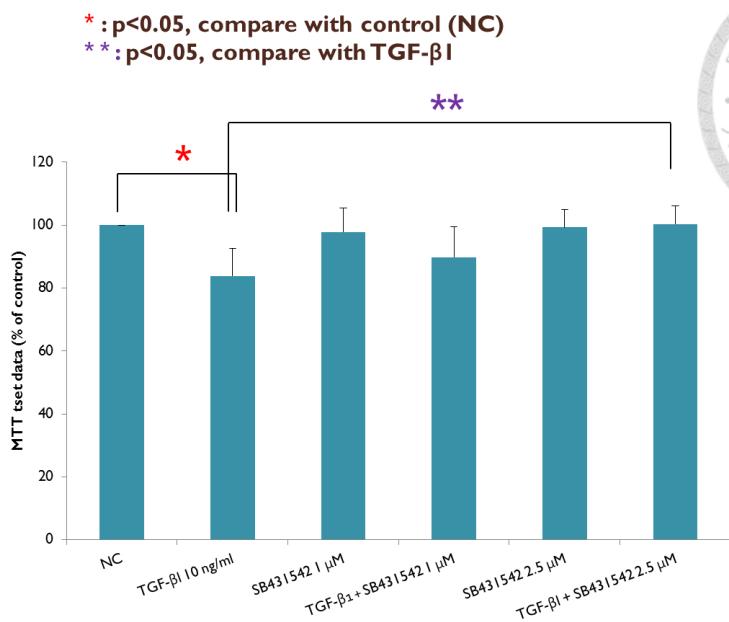


圖 5：MTT：牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml 及 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 觀察 5 天 (n=8)。加入 TGF- $\beta$ 1，細胞數目與對照組相比有下降的趨勢。SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 與對照組相比沒有明顯差異。加入 TGF- $\beta$ 1 及 SB431542 (1  $\mu$ M) 與對照組或 TGF- $\beta$ 1 相比沒有差異，而加入 TGF- $\beta$ 1 及 SB431542 (2.5  $\mu$ M) 與 TGF- $\beta$ 1 相比，細胞數目回升有達到統計差異。

\*: 與對照組相比，p<0.05

\*\*: 與 TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml 組相比，p<0.05

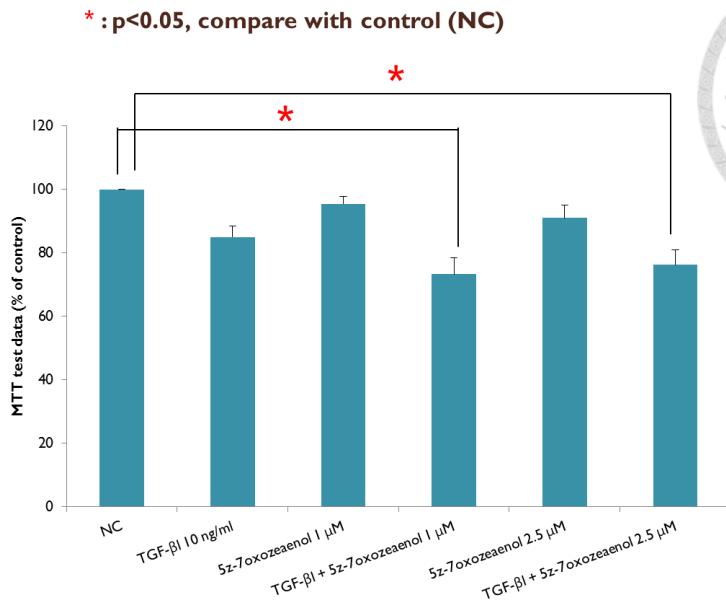


圖 6：MTT：牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml 及 5z-7oxozeanol (1, 2.5  $\mu$ M) 觀察 5 天 (n=3)。加入 TGF- $\beta$ 1，和 5z-7oxozeanol (1, 2.5  $\mu$ M)，三組與對照組相比細胞數目沒有明顯差異。加入 TGF- $\beta$ 1 及 5z-7oxozeanol (1, 2.5  $\mu$ M) 與對照組相比，細胞數量降低有統計上差異。

\*: 與對照組相比，p<0.05

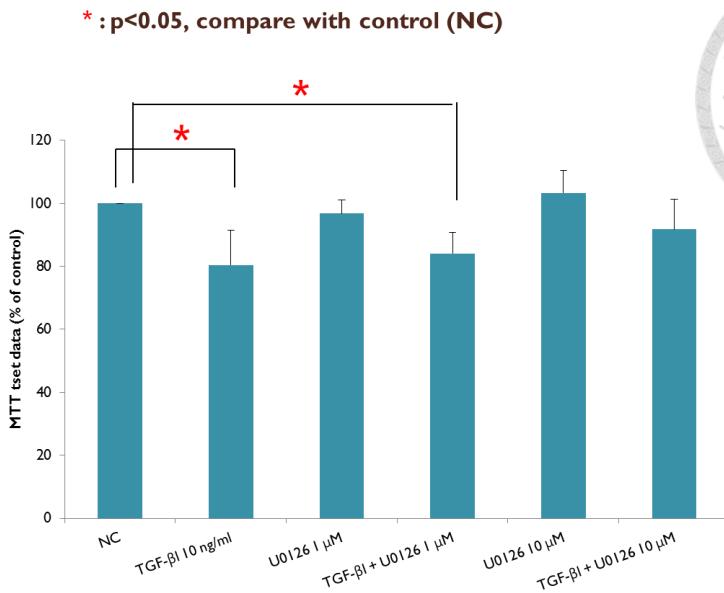
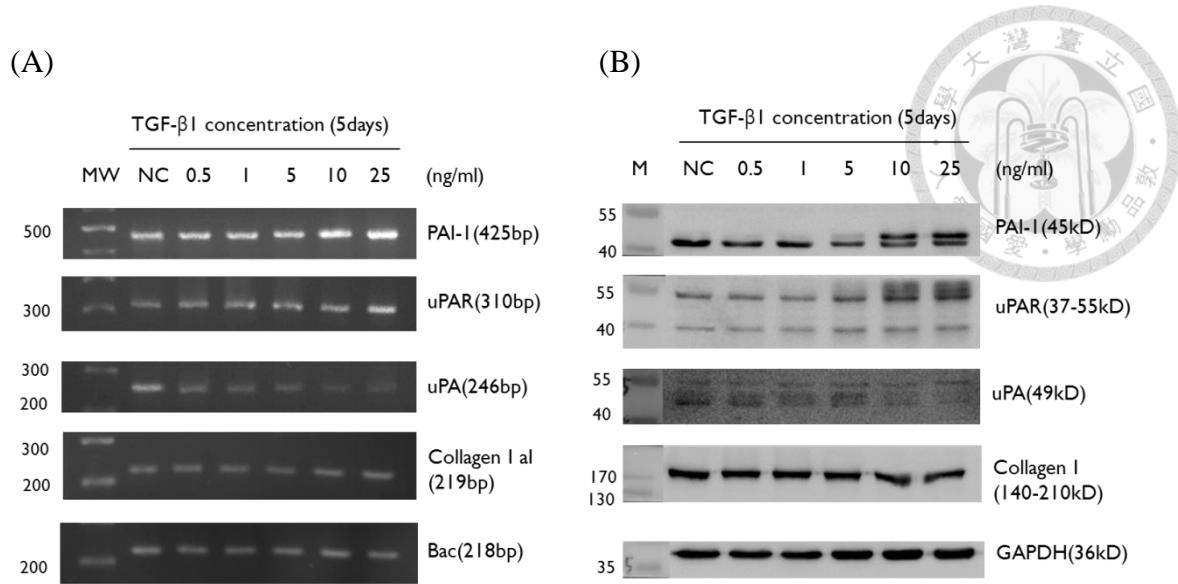
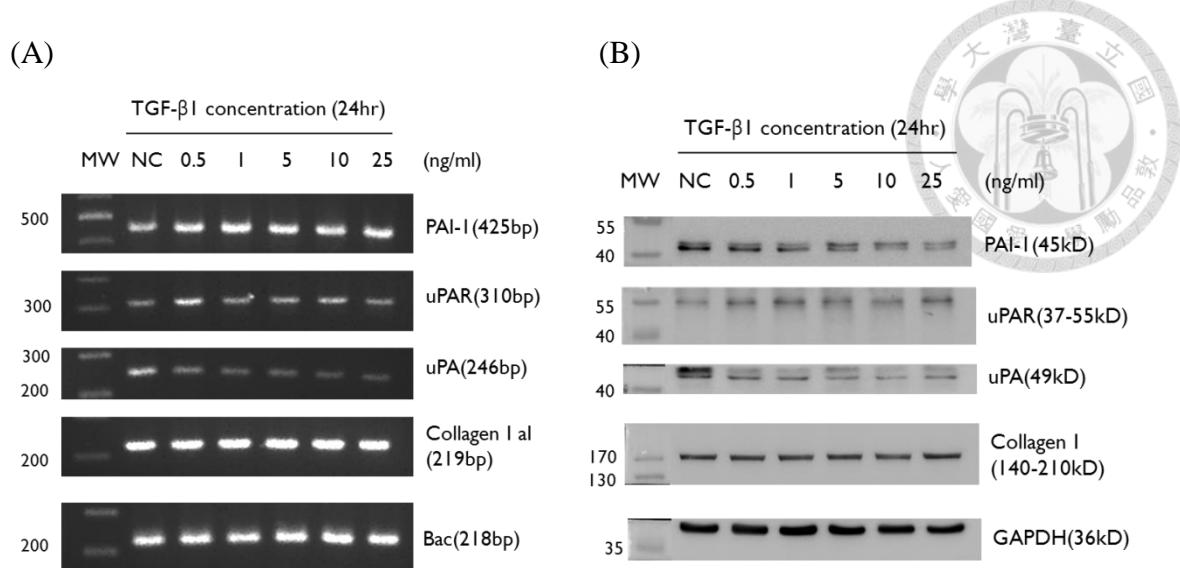


圖 7:MTT:牙髓細胞加入TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml及U0126 (1, 10  $\mu$ M) 觀察5天 (n=9)。加入TGF- $\beta$ 1，細胞數目與對照組相比有下降。U0126 (1, 10  $\mu$ M) 與對照組相比，細胞數目沒有明顯差異。加入TGF- $\beta$ 1 與低濃度U0126 (1  $\mu$ M) 和對照組比較有抑制細胞數目，而加入TGF- $\beta$ 1 與高濃度U0126 (10  $\mu$ M) 和對照組相比則沒有明顯差異。

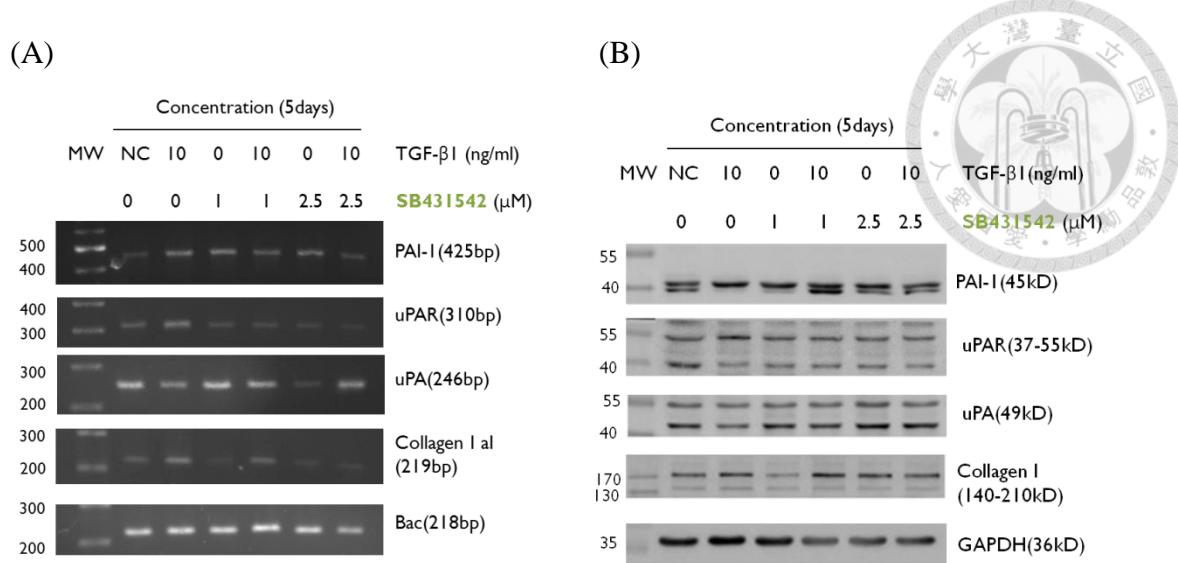
\*: 與對照組相比，p<0.05



**圖 8：RT-PCR 與 Western Blot：牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 0.5, 1, 5, 10, 25 ng/ml 觀察 5 天。(A) RT-PCR：加入不同濃度的 TGF- $\beta$ 1，PAI-1 和 uPAR 表現量上升，uPA 表現量下降，collagen I 沒有明顯改變。(B) Western Blot：加入不同濃度的 TGF- $\beta$ 1，PAI-1 和 uPAR 表現量上升，uPA 表現量下降，collagen I 沒有明顯改變。**



**圖 9：RT-PCR 與 Western Blot：牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 0.5, 1, 5, 10, 25 ng/ml 觀察 24 小時。(A) RT-PCR：加入不同濃度的 TGF- $\beta$ 1，PAI-1 和 uPAR 表現量上升，uPA 表現量下降，collagen I 沒有明顯改變。(B) Western Blot：加入不同濃度的 TGF- $\beta$ 1，PAI-1 和 uPAR 表現量上升，uPA 表現量下降，collagen I 沒有明顯改變。**



**圖 10：RT-PCR 與 Western Blot：牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 10ng/ml 及 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 觀察 5 天。(A) RT-PCR：加入 TGF- $\beta$ 1，PAI-1、uPAR 和 collagen I 表現量受到 SB431542 (2.5  $\mu$ M) 抑制而下降，uPA 在 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 的逆轉下表現量上升。(B) Western Blot：加入 TGF- $\beta$ 1，PAI-1 和 uPAR 表現受到 SB431542 (2.5  $\mu$ M) 抑制而下降，collagen I 沒有顯著變化，uPA 在 SB431542 (2.5  $\mu$ M) 逆轉下表現量上升。**

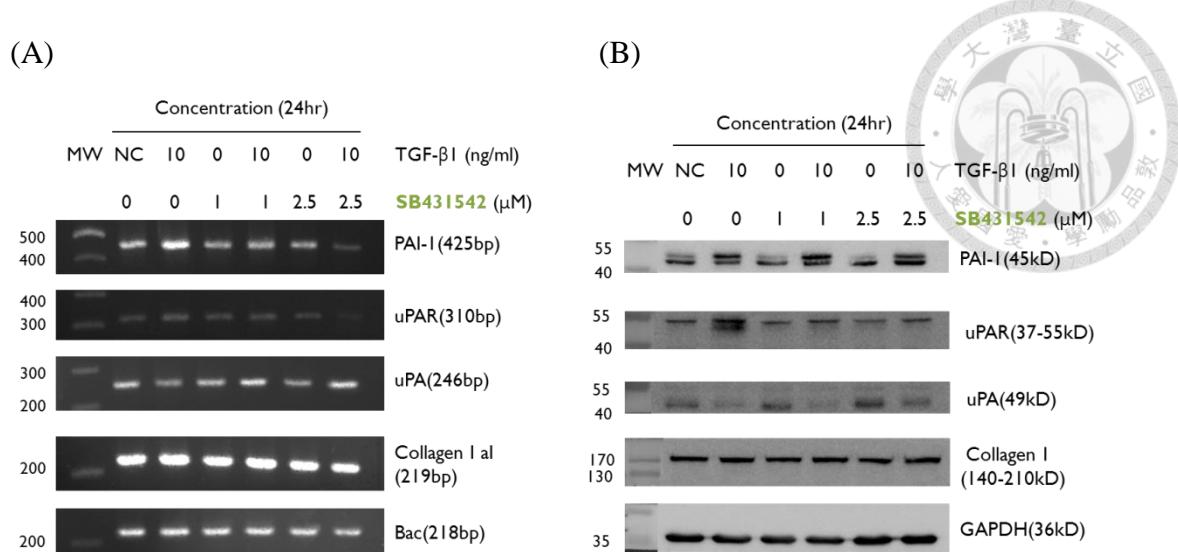
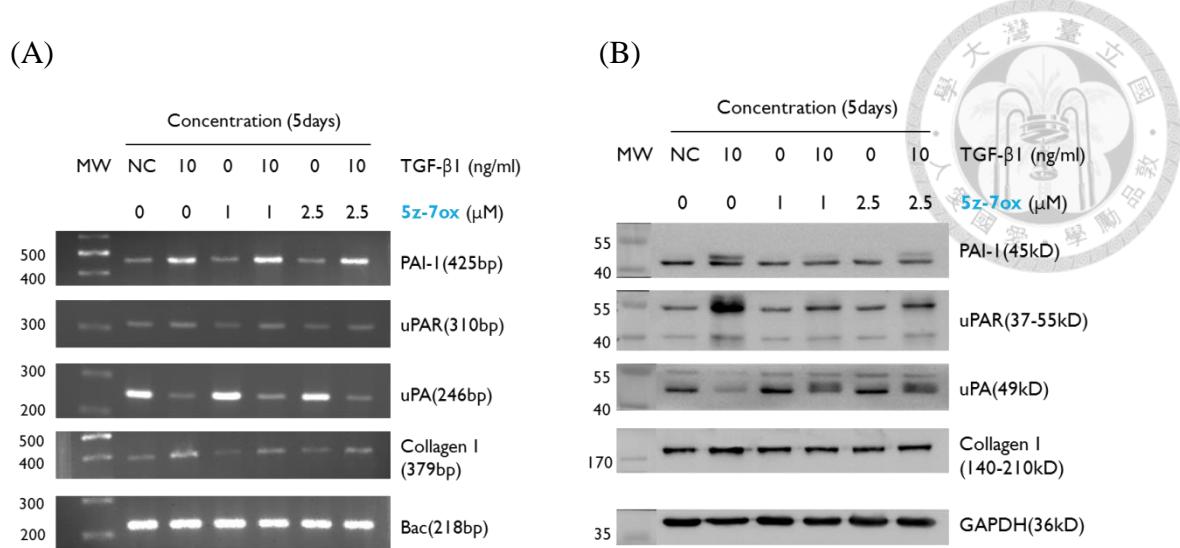
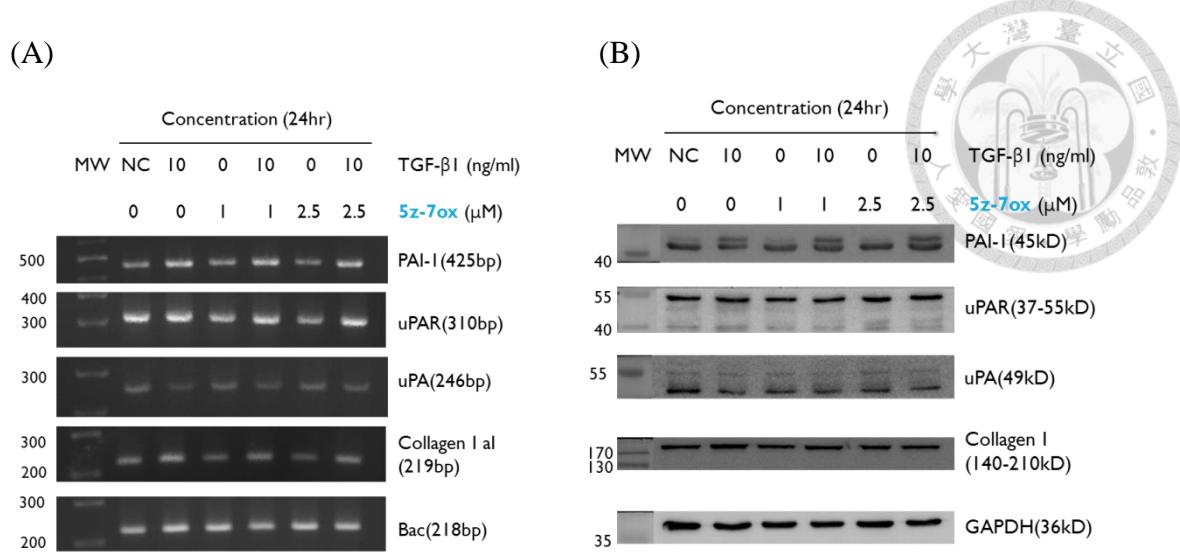


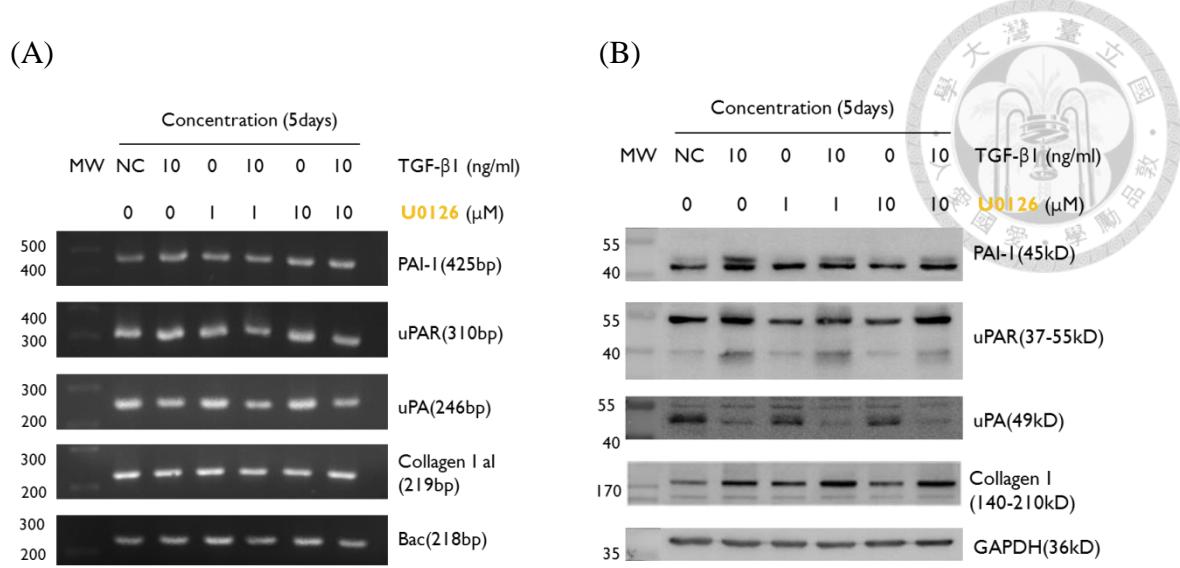
圖 11：RT-PCR 與 Western Blot：牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 10ng/ml 及 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 觀察 24 小時。(A) RT-PCR：加入 TGF- $\beta$ 1，PAI-1、uPAR 表現量受到 SB431542 (2.5  $\mu$ M) 抑制而下降，uPA 在 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 的逆轉下表現量上升，collagen I 表現量沒有受到抑制劑影響。(B) Western Blot：加入 TGF- $\beta$ 1，PAI-1 和 collagen I 沒有受到抑制劑影響，uPAR 蛋白受到 SB431542 (1, 2.5  $\mu$ M) 作用而下降，uPA 在 SB431542 (2.5  $\mu$ M) 逆轉下上升。



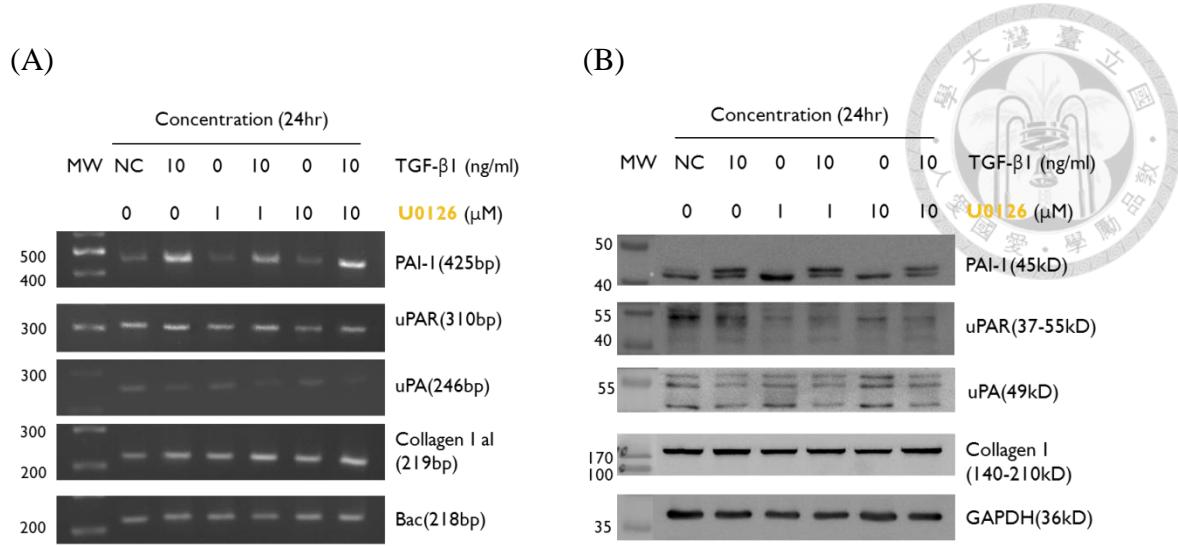
**圖 12:RT-PCR 與 Western Blot: 牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 10ng/ml 及 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5 μM) 觀察 5 天。(A) RT-PCR：加入 TGF- $\beta$ 1，PAI-1、uPAR、uPA 和 collagen I 表現量沒有受到抑制劑影響。(B) Western Blot：加入 TGF- $\beta$ 1，PAI-1 和 uPAR 表現量受 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5μM) 而下降，uPA 在 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5μM) 影響下表現量上升。Collagen I 表現量沒有改變。**



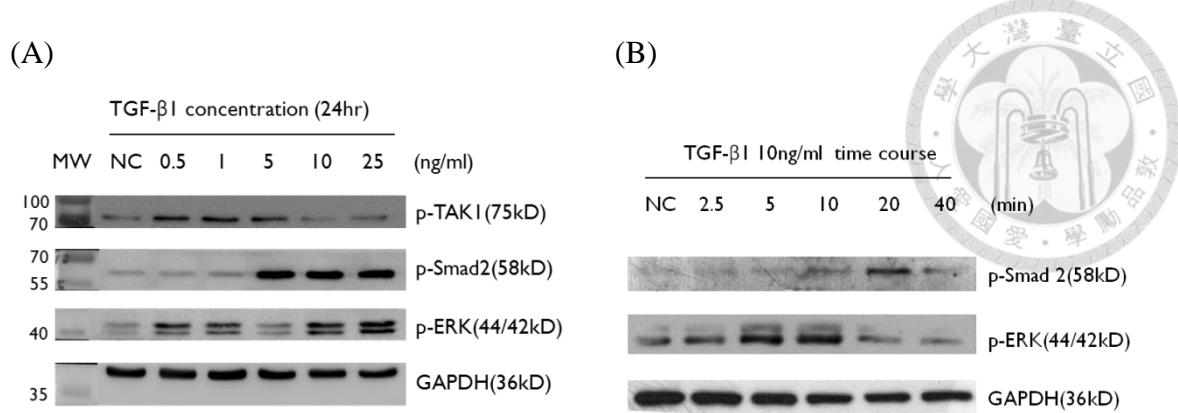
**圖 13:RT-PCR 與 Western Blot：牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 10ng/ml 及 5z-7-oxozeaenol (1, 2.5  $\mu$ M) 觀察 24 小時。(A) RT-PCR：加入 TGF- $\beta$ 1, PAI-1、uPAR、uPA 和 collagen I 表現量沒有受到抑制劑影響。(B) Western Blot：加入 TGF- $\beta$ 1，同樣發現 PAI-1、uPAR、uPA 和 collagen I 表現量沒有受到抑制劑影響。**



**圖 14：RT-PCR 與 Western Blot：牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 10ng/ml 及 U0126 (1, 10  $\mu$ M) 觀察 5 天。(A) RT-PCR：加入 TGF- $\beta$ 1，PAI-1、uPAR、uPA 和 collagen I 表現量沒有受到抑制劑影響。(B) Western Blot：加入 TGF- $\beta$ 1，PAI-1 的表現量受 U0126 (1, 10  $\mu$ M) 影響而下降，uPAR、uPA 和 collagen I 則沒有受到抑制劑影響。**



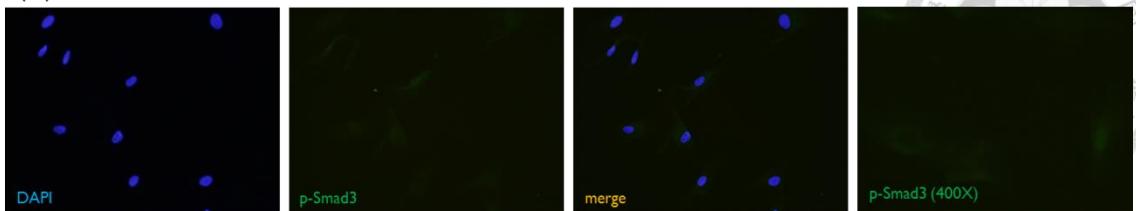
**圖 15：RT-PCR 與 Western Blot：牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 10ng/ml 及 U0126 (1, 10  $\mu$ M) 觀察 24 小時。(A) RT-PCR：加入 TGF- $\beta$ 1，PAI-1、uPAR、uPA 和 collagen I 表現量沒有受到抑制劑影響。(B) Western Blot：加入 TGF- $\beta$ 1，uPAR 因 U0126 (1, 10  $\mu$ M) 影響而下降，而 PAI-1、uPA 和 collagen I 表現量沒有受到抑制劑影響。**



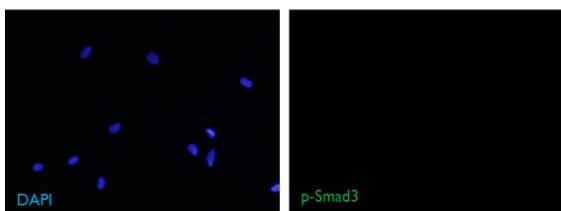
**圖 16：Western Blot：**牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 0.5, 1, 5, 10, 25 ng/ml 觀察 24 小時，以及加入 TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml 觀察 0-40 分鐘。(A) 加入不同濃度的 TGF- $\beta$ 1，p-TAK1 在濃度 0.5-5 ng/ml 時上升，10-25 ng/ml 下降；p-Smad2 在 5-25 ng/ml 上升；p-ERK 在 0.1-0.5 ng/ml 時上升、1 ng/ml 下降、10-25 ng/ml 又再度上升。(B) 加入 TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml，觀察到 p-Smad3 在 20 分鐘有明顯表現，p-ERK 則在 5-10 分鐘有明顯表現。



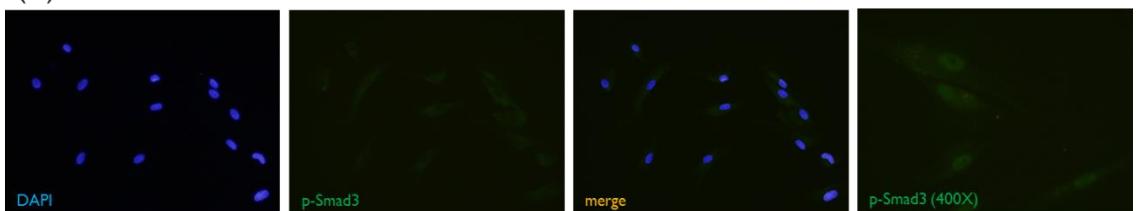
(A) Control



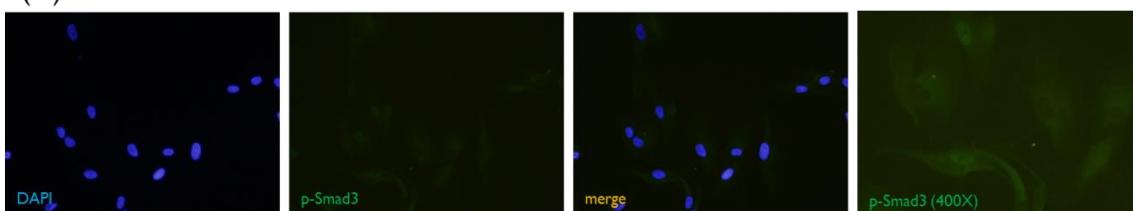
(B) TGF- $\beta$ 1, no Primary antibody



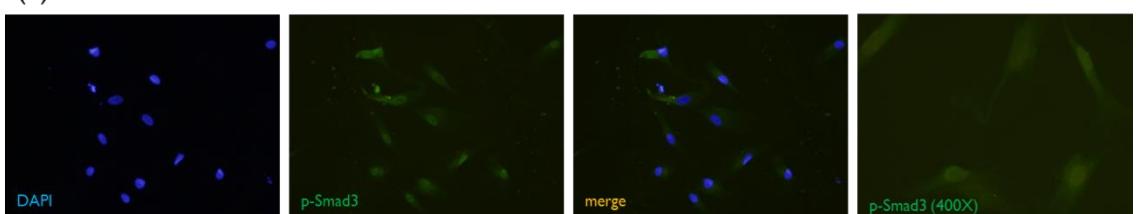
(C) 5min



(D) 10min



(E) 30min



(F) 60min

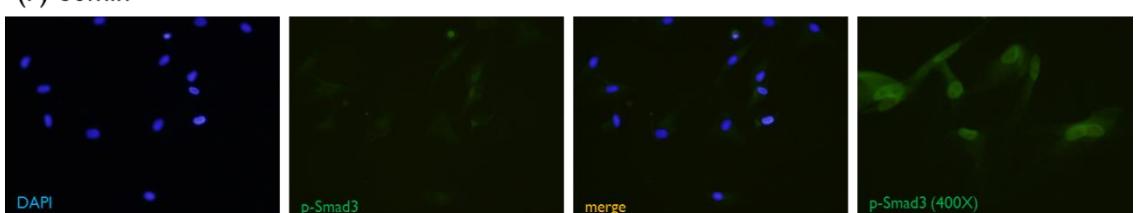


圖 17：Immunofluorescence：牙髓細胞加入 TGF- $\beta$ 1 10ng/ml 觀察 0-60 分鐘。可

以觀察到加入 TGF- $\beta$ 1 30-60 分鐘，牙髓細胞細胞核表現 p-Smad3。

DAPI：染牙髓細胞的細胞核。

p-Smad3：接上綠色螢光的 p-Smad3 抗體。

merge：DAPI 與 p-Smad3 重疊後的影像。

p-Smad3 (400x)：接上綠色螢光的 p-Smad3 抗體，以 400 倍觀察



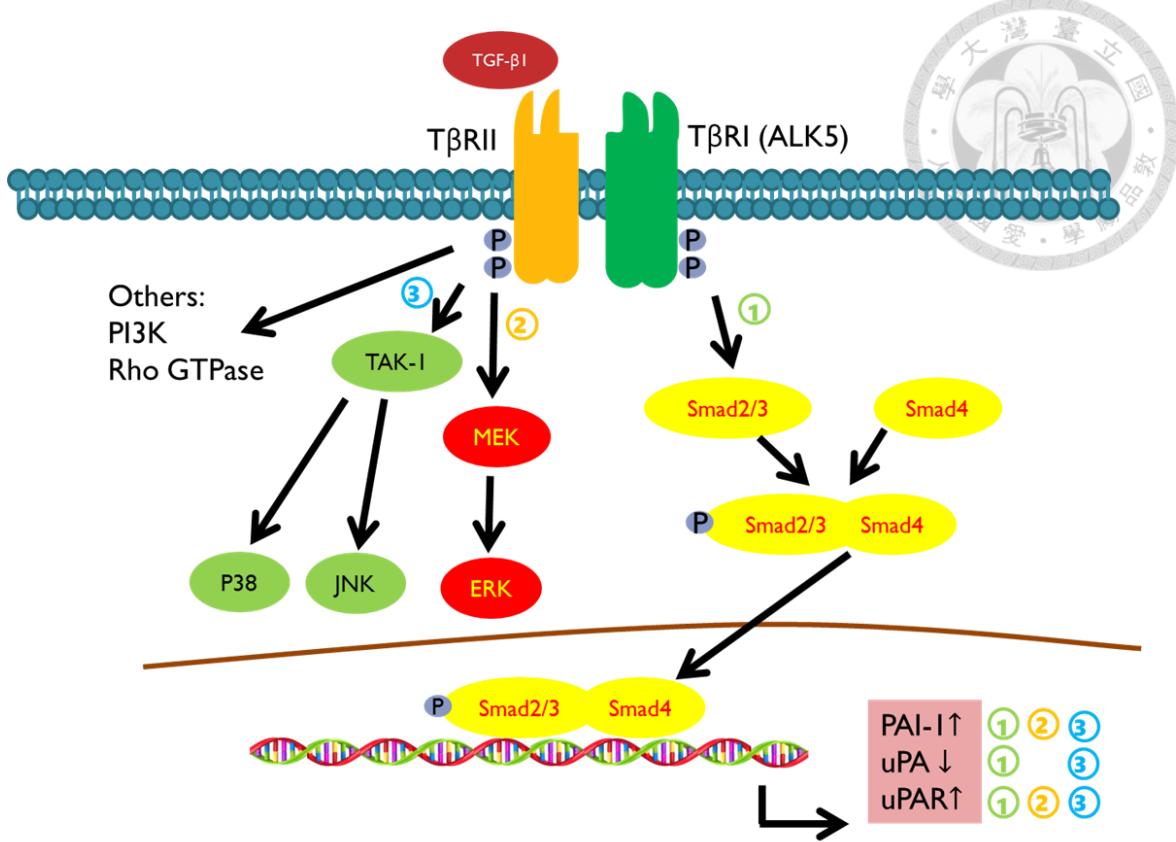


圖 18：TGF- $\beta$ 1 調控人類牙髓細胞 PA 系統的訊息路徑示意圖。TGF- $\beta$ 1 和 T $\beta$ RII 結合後，活化 T $\beta$ RI，往下會啟動①ALK5/Smad2/3、②MEK/ERK、③TAK1 三條 Smad/non-Smad 路徑，來影響 PAI-1、uPA 和 uPAR 三者的表現。透過①②③三條路徑，會使 PAI-1 和 uPAR 的表現量而上升；而透過①③兩條路徑，則會使 uPA 的表現量下降。