

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 研究根管充填劑對人類骨細胞中 MAPKs, NF- $\kappa$ B, OPG/RANKL 的影響 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 96-2314-B-040-036-  
執行期間：96年08月01日至97年07月31日  
執行單位：中山醫學大學牙醫學系

計畫主持人：黃富美  
共同主持人：張育超  
計畫參與人員：其他-兼任助理人員：楊博喻

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中華民國 97年09月16日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

(計畫名稱)

研究根管充填劑對人類骨細胞中 MAPKs, NF- $\kappa$ B, OPG/RANKL 的影響

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC - 96 - 2314 - B - 040 - 036

執行期間：96 年 8 月 1 日至 97 年 7 月 31 日

計畫主持人：黃富美

共同主持人：張育超

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：

中 華 民 國 97 年 9 月 15 日

## 英文摘要

Keywords: root canal sealers, osteoblasts, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)

An ideal root canal sealer should be nonirritating to the surrounding tissues. Good tissue compatibility is decisive for root canal sealers because they may come into direct contact, especially when extruded, with the periapical tissues. Unfortunately, all histological investigation demonstrated that all types of root canal sealers could induce mild to severe inflammatory alternations within apical tissues. However, there is little information on the precise mechanisms about root canal sealers-induced inflammatory reaction. A recently identified tumor necrosis factor family molecule, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) play a critical role in the development of osteoclasts that result in bone resorption. The aim of this study was to investigate the effects of root canal sealers AH26, Canals, and N2 on the expression of RANKL in human osteoblast cell line U2OS cells. The exposure of U2OS cells to root canal sealers resulted in the upregulation of RANKL mRNA expression ( $p < 0.05$ ). The rank of RANKL increased in an order of  $N2 > AH26 > Canals$ . Taken together, the activation of RANKL may play an important role in the pathogenesis of root canal sealers-induced periapical bone destruction.

## 中文摘要

關鍵詞：根管充填劑、蝕骨細胞生成分子、骨細胞

理想根管充填劑應該對根尖周遭組織是無刺激性。因為經為確保根管及側根管完全密閉充填，常將根管充填劑擠壓至根管尖外或由側根管擠壓至根管外。這些根管充填劑材料常被擠壓至根尖外，雖然過一段時間會慢慢被組織所吸收，但與根尖組織仍有長時間直接接觸，有良好生物相容性的確具有首要重要性。但非常遺憾的是所有組織學的研究，都顯示各種類型的根管充填劑都會對根尖周圍組織造成不同程度的發炎反應。RANKL 為腫瘤壞死因子受器家族成員之一，研究顯示，造骨細胞之 RANKL 基因表現與骨質溶解有密切相關。關於根管充填劑對骨細胞之影響，所進行的研究並不多。因此本研究擬偵測環氧樹脂類根管充填劑 (AH26) 和鋅氧化物-丁香油酚基的 (Canals 和 N2) 根管充填劑對人類類骨細胞 U2OS 細胞之影響，利用 RT-PCR、ELISA 的方法分析 RANKL 含量的變化情形，結果發現根管充填劑會誘發 U2OS 細胞產生 RANKL ( $p < 0.05$ )。根管充填劑對於根尖病灶產生可能與會根管充填劑會誘發骨細胞產生 RANKL 有關。

## 背景及目的

根管充填劑應該是具有生物相容性的和有令人滿意的物理與化學的性質 (Grossman 1970; Nguyen 1991)。所有組織學的研究，都顯示各種類型的根管充填劑 (如鋅氧化物-丁香酸類、鈣氫氧化鈣類和環氧樹脂類的)。都會對根尖周圍組織造成不同程度的發炎反應。

根管充填劑對生物細胞所造成的影響，與接觸之根管充填劑種類、濃度高低、時間長短及細胞種類有直接的關係。一般認為為確保根管及側根管完全密閉充填；以及對於根尖病灶修復，常將根管充填劑擠壓至根管尖外或由側根管擠壓至根管外。因此根管充填劑經常可能與根管外骨組織有直接的接觸，回顧文獻中關於根管充填劑對骨細胞之影響，所進行的研究並不多。因此本研究擬偵測各種類根管充填劑對骨細胞之影響。

RANKL 為腫瘤壞死因子受器家族成員之一，其主要功能為刺激蝕骨細胞分化及抑制蝕骨細胞之凋零死亡，使活化之蝕骨細胞總數增加。而研究顯示，造骨細胞之 RANKL 基因表現與骨質溶解有密切相關。RANKL 屬於 TNF super-family 的一員，大小為 317 amino acid。RANKL 以 2 種 form 存在：(1) membrane form：molecular weight 為 35.5 KD，是一種 transmembrane glycoprotein，有一個 extracellular stalk，它的 receptor-binding domain 位於這個 stalk 上 (2) soluble form：molecular weight 為 27.7 KD，membranous RANKL 經

proteolytic enzyme 如：TNF- $\alpha$  converting enzyme, metalloprotease 的 cleavage 後釋放出去。至於 2 者的功效哪種較強，研究指出在 human cell 中，soluble form 對 osteoclastogenesis 的刺激效果大於 membranous form，而在 murine cell 中則以 membrane type 的刺激效果較強。此外，亦有報告指出 membranous form 主要與 maintaining bone homeostasis 有關，soluble form 則與 pathologic bone resorption 有關。這 2 種 RANKL 皆可和位於 macrophage 的 cell surface receptor：RANK 結合。RANK 是一個 616 amino-acids transmembrane protein，它一旦與 RANKL 結合後會促進多種 TNF receptor-associated factors (TRAFs) 的 recruitment 到 cell membrane，其中以 RANK/TRAF6 interaction 對 osteoclastogenesis 最具影響力，研究顯示 TRAF6 的 downstream signaling pathway 如：p38 MAPK, MEK/ERK MAPK pathway 皆會促進 osteoclast differentiation 及 function，此外 TRAF6-deficiency mice 亦因 osteoclast 的功能不全而導致 osteopetrosis。

bone destruction 發生過程中，RANKL 都扮演著非常重要的角色。本研究擬以組織培養法培養人類類骨細胞 U2OS 細胞，測試各種類根管充填劑是否會誘發細胞分泌 RANKL 與骨頭破壞相關因子。

## 方法

### 試片製備

我們把所使用的根管充填劑材料分成環氧樹脂類根管充填劑 AH26 和鋅氧化物-丁香油酚基的 Canals 和 N2。接下來將這些根管充填劑依廠商說明指示調拌均勻，取一定量根管充填劑放入 2x35 mm 之圓形玻璃盤來做實驗，調拌後馬上浸泡在 40cc 不含血清 DMEM 培養液之玻璃瓶密封，置入 37°C 自動恆溫培養箱中浸泡 48 小時，分別收集浸泡釋出液，經過 0.22  $\mu$ m 濾滅菌處理作為實驗用。

### 細胞培養

培養人類 U2OS cells (American Tissue Type Collection HTB 96)，培養含有 10% 胎牛血清及 1% PSN (penicillin, streptomycin, neomycin, GIBCO; Grand Island, NY, USA) 之 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO; Grand Island, NY, USA) 培養液中，置入 37°C 自動恆溫培養箱中培養。

### 逆反轉聚合鏈反應

取 2  $\mu$ g 的 RNA，加入適量的 DEPC-H<sub>2</sub>O 後到 33  $\mu$ l，以 70 °C 處理 5 分鐘。再加入 RNase inhibitor (40U/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l，再加入 5 倍 RT buffer 10  $\mu$ l 及 dNTP (2.5 mM) 4  $\mu$ l，和 Oligo dT 1  $\mu$ l (50 pmole/ $\mu$ l) 及 RTase 1  $\mu$ l (200U/ $\mu$ l)，在 42°C 反應 1 小時之後，改以 99°C 作用 5 分鐘後保存在 4°C。PCR (polymerase chain reaction)：取 5  $\mu$ l cDNA 加入適量的 DEPC-H<sub>2</sub>O 至 26  $\mu$ l，加入 primer-5' 和 primer-3' 各 5  $\mu$ l，加入 3.2  $\mu$ l dNTP (2.5 mM) 及 5  $\mu$ l 10X PCR buffer 最後再加入 DNA polymerase 1  $\mu$ l (2U/ $\mu$ l)，置於溫度循環機 94°C 1 分鐘之後，annealing 溫度 1 分鐘，72°C 2 分鐘共 30 個循環，最後再以 72°C 反應 20 分鐘，並於 4°C 保存。而各個基因的 PCR primers 序列如下：

RANKL： 5'-CCGAGACTACGGCGGATCCTAACA-3'

5'-TCAGTCTATGTCCTGAACTTTGAAAGCCCC-3'

### DNA 電泳

先配置 DNA gel，取 10  $\mu$ l 的 PCR 產物加上 2  $\mu$ l 的 6 倍 loading dye，加到 DNA gel。於電壓 100V，進行電泳 45 分鐘之後，以 1  $\mu$ g/ml Ethidium bromide 染色，再以 ddH<sub>2</sub>O 退染，於 UV 燈下分析並記錄之。

### 免疫酵素螢光定量分析

先於 96 孔培養皿 coating Anti- RANKL monoclonal antibody (5 µg/ml) 37°C 1 小時，再將 condition medium 加入作用 1 小時後，經洗滌後加入 secondary Anti- RANKL monoclonal antibody (5 µg/ml) 1 小時，以 ELISA reader 作定量分析，根據 standard curve 換算 RANKL 的濃度。

### 結果

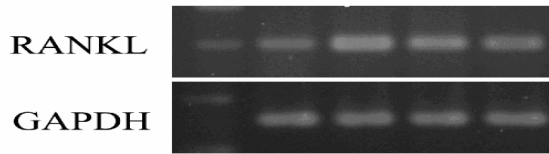


Fig. 1 Expression of RANKL mRNA gene stimulated with various concentrations of root canal sealers in U2OS cells by RT-PCR.

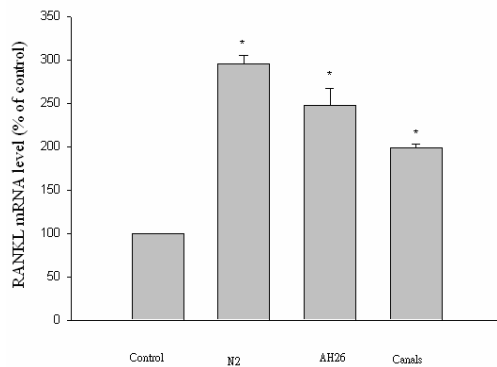


Fig. 2 Levels of RANKL mRNA gene treated with nicotine were measured by AlphaImager 2000. The relative level of RANKL mRNA gene expression was normalized against GAPDH mRNA signal and the control was set as 1.0. Optical density values represent the mean ± SD. \* represents significant differences from control values with  $p < 0.05$ .

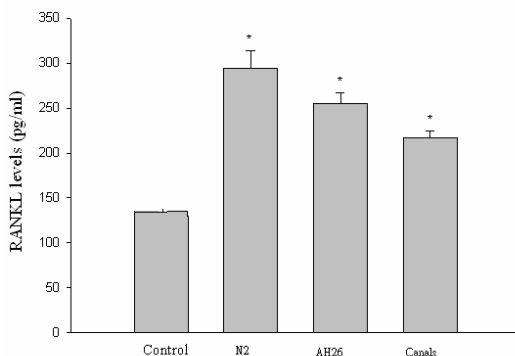


Fig. 3 Expression the protein levels RANKL of conditioned medium from U2OS cells treated with various root canal sealers.

## 參考文獻

- Boyle WJ, Smonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-42.
- Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ (1998) Trance is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclast. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 997-1001.
- Grossman LI. Endodontic practice. 7th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1970; 329-77.
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al (1999a) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315-23.
- Kong YY, Feige U, Sarosi I, et al. (1999b) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* **402**, 304-9.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165-76.
- Nguyen TN. Obturation of the root canal system. In: Cohen S, Burns RC, eds. Pathways of the pulp. 5<sup>th</sup> ed. St. Louis, MO: Mosby, 1991; 193-282.
- Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Pattamapun K, Pavasant P. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 and increases receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2004; 75: 1647-54.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceeding of National Academy Sciences United State of American* **95**, 3597-602.

## 出席國際學術會議心得報告

計畫編號	NSC-96-2314-B-040-036
計畫名稱	研究根管充填劑對人類骨細胞中 MAPKs, NF- $\kappa$ B, OPG/RANKL 的影響
出國人員姓名	黃富美
服務機關及職稱	中山醫學大學牙醫學系教授
會議時間地點	July 2-5, 2008, Toronto, ON, Canada
會議名稱	第 86 屆國際牙醫研究學會年會 86th General Session & Exhibition of the IADR
發表論文題目	根管充填劑誘發體外人類骨細胞中基質金屬蛋白酶的表達 Upregulation of MMPs by root canal sealers in human osteoblasts.

### 一、參加會議經過

今年的國際牙醫研究學會年會於加拿大多倫多舉行，因位於加拿大東岸，沒有直飛的班機，因此路途較遠轉機過程較為辛苦，因油價飆漲機票超貴且一位難求，但參加人數仍不少，本屆年會盛況空前共有 3597 篇論文發表。同時又遇上加拿大與美國國慶，因此旅遊人潮較多，故旅館安排觀光景點時間掌控較為困難。

國際牙醫研究學會年其論文發表形式分為 Hand-on Workshop、Oral presentation、Poster presentation 三種。筆者今年以 Poster presentation 方式發表。報告的論文題目為：根管充填劑誘發體外人類骨細胞中基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases，簡稱 MMPs)的表達。目前所知的 MMPs 家族，依結構與受質的特異性可分為四大類；其中一類明膠酶(gelatinases)，包括 MMP-2 與 MMP-9，其主要作用是降解基底膜中的 type IV 膠原蛋白，在基底膜的破壞過程中扮演著重要角色。其中之一或是兩者的過度表達(over-expression)可使細胞能夠裂解(cleave) type IV 膠原蛋白並穿過基底膜，可能造成骨細胞破壞允許骨頭病變發生。指出明膠酶可能是涉根尖組織病變及骨細胞破壞的主要因子。實驗採用細胞培養中利用明膠酶譜(gelatin zymography)發現 MMP-2 和 MMP-9 過度表達，利用明膠酶譜定量，發現 MMP-9 的表達亦有隨時間增強的趨勢。

今年的國際牙醫研究學會年會 poster presentation 報告的論文題目為” Upregulation of MMPs by root canal sealers in human osteoblasts”。摘要如下：

**Objectives:** Histological investigations have demonstrated that root canal sealers can induce mild to severe inflammatory alternations. The proteolysis of extracellular matrix by matrix metalloproteinases (MMPs) seems to be a key initiating event for the progression of the inflammatory process. The aim of this study was to investigate the effects of root canal sealers AH26, Canals, and N2 on the expression of MMPs in human osteoblast cell line U2OS cells.

**Methods:** Freshly mixed materials were filled in glass rings (4 mm height and 10 mm in diameter) and eluted in 10 ml of culture medium for 1 day. Subsequently, various dilutions (final dilution: 1/2, 1/4, and 1/8) of these extraction media were prepared for this study. Cytotoxicity was measured by the Hoechst 33258 fluorescence assay. The levels of gelatinolytic activities were measured by the gelatin zymography. **Results:** The results showed that AH26, Canals, and N2 were cytotoxic to U2OS cells in a concentration-dependent manner ( $p < 0.05$ ). The gelatin zymograms revealed that MMP-2 (72 kDa) and MMP-9 (92 kDa) were secreted by U2OS cells. The exposure of U2OS cells to root canal sealers resulted in the upregulation of MMP-2 and -9 expression ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Taken together, the activation of MMP-2 and -9 may play an important role in the pathogenesis of root canal sealers-induced periapical inflammation.

## 二、與會心得

本次盛會收穫良多，吸取了許多寶貴的經驗及目前研究的新方向，對於往後的研究裨益良多，再此亦非常感激國科會予以經費補助參與此次國際牙醫研究學會年會。國際牙醫研究學會已受到政治的介入，臺灣無法自己成立單獨的 division，目前歸在 South-East Asian Division，而中共加入即自成 China Division，政府應正視此一現象。