

ผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์

Effect of Cobalt Chloride on Stemness in Human Dental Pulp Cells

กัณตพร ลักขณา (Kantaporn Laksana)* ดร.สิริรัตน์ สุอัมพันธ์ (Dr.Sireerat Sooampon)**

ดร.วรรณธิดา ศรีอาจ (Dr.Wantida Sriarj)***

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อพฤติกรรมพื้นฐานของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ โดยศึกษาถึงการแสดงออกของยีนออกท์-4 ซ็อกซ์-2 และนาโนก ซึ่งเป็นยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด นอกจากนี้ยังศึกษาถึงการแบ่งตัวของเซลล์และการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งจากการศึกษาพบว่าโคบอลต์คลอไรด์ส่งผลให้เซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์เพิ่มการแสดงออกของยีนที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และการแปรสภาพเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ผลการทดลองดังกล่าวอาจสรุปได้ว่าโคบอลต์คลอไรด์มีผลเพิ่มความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ตามความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น

ABSTRACT

The objective of this study is to investigate the effect of cobalt chloride on the stemness in human dental pulp cells by determining the expression of stem cell marker genes (Oct-4, Sox-2 and Nanog), proliferation and osteogenic differentiation. The results of this study showed that cobalt chloride increased expression of gene markers, while inhibited proliferation rate and osteogenic differentiation of human dental pulp cells. Therefore, cobalt chloride may increase stemness of human dental pulp in a dose-dependent relationship.

คำสำคัญ: โคบอลต์คลอไรด์ เซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด

Key Words: Cobalt chloride, Human dental pulp cells, Stemness

* นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** อาจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*** อาจารย์ ภาควิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์เนื้อเยื่อในพินของมนุษย์สามารถพบได้ทั้งในพินน้ำนมและพินแท้ ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้มีคุณสมบัติในการแบ่งตัวได้อย่างต่อเนื่อง และสามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ทุกชนิด อันได้แก่ เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) เซลล์ประสาท (neuron) เซลล์ไขมัน (adipocyte) เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (myocyte) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) (Gronthos, Mankani, Brahimi, Robey, and Shi, 2000; Gronthos et al., 2002; Koyama, Okubo, Nakao, and Bessho, 2009) ทำให้เซลล์จากเนื้อเยื่อในพินมีศักยภาพในการนำมาใช้ในทางคลินิกเพื่อส่งเสริมให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนในบริเวณที่มีการทำลายของกระดูก เนื้อพิน หรือเส้นประสาทได้ อย่างไรก็ตามในการนำเอาเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในพินมาใช้ในทางคลินิกนั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัย เพื่อเพิ่มความเข้าใจในพฤติกรรมและการตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งแวดล้อมทั้งนี้เพื่อที่จะนำเซลล์ไปใช้ได้อย่างปลอดภัย และมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปในการศึกษาถึงคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด มักจะทำการศึกษาถึงการแสดงออกของยีน เช่น อ็อกเทเมอร์-4 หรืออ็อกท์-4 (POU transcription factor Octamer-4; Oct-4) ซ็อกซ์-2 (Sox-2) และนาโนก (Nanog) ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (Kerkis et al., 2006; Avilion et al., 2003)

ระดับของออกซิเจนภายในเนื้อเยื่อจัดเป็นปัจจัยข้อหนึ่งที่ส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ต้นกำเนิด โดยมีการศึกษาพบว่าระดับออกซิเจนที่เหมาะสมถือเป็นสิ่งแวดล้อมที่สำคัญต่อการแบ่งตัวและคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด โดยพบว่าในสภาวะตามปกติเนื้อเยื่อต่างๆ จะมีปริมาณออกซิเจนที่ต่ำกว่าระดับของออกซิเจนในอากาศ หรือที่เรียกว่าสภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia) โดยมีการวัดระดับของออกซิเจนที่เนื้อเยื่อต่างๆ เช่น สมองมีระดับของออกซิเจนอยู่ที่

ร้อยละ 0.5 ถึง 7 (Whalen, Granfield, and Nair, 1970) ไชกระดูกมีระดับออกซิเจนร้อยละ 0 ถึง 4 (Chow, Wenning, Miller, and Papoutsakis, 2001) ส่วนเนื้อเยื่อในพินนั้นได้มีการศึกษาวัดระดับออกซิเจนในเนื้อเยื่อพินของหนูและกระต่าย พบว่ามีระดับออกซิเจนเพียงร้อยละ 3 และ 4.5 ตามลำดับ (Kozam, 1967; Yu, Boyd, Cringle, Alder, and Yu, 2002) จึงอาจกล่าวได้ว่าระดับของออกซิเจนที่ภาวะปกติของอวัยวะเหล่านั้นเป็นสภาวะพร่องออกซิเจนเมื่อเทียบกับระดับของออกซิเจนที่วัดได้ในบรรยากาศทั่วไป หรือเรียกว่าเป็นระดับพร่องออกซิเจนทางสรีรวิทยา (physiologic hypoxia) (Guzy and Schumacker, 2006)

โดยปกติการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในพินในห้องปฏิบัติการนั้น มักทำที่ระดับออกซิเจนร้อยละ 21 เทียบเท่ากับระดับออกซิเจนในบรรยากาศ ซึ่งมีความแตกต่างจากสภาพแวดล้อมตามความเป็นจริงของเซลล์ต้นกำเนิด ระดับของออกซิเจนอาจจะทำให้พฤติกรรมและความสามารถในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดถูกเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม การจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการสามารถทำได้ 2 วิธี คือทางกายภาพและการเติมสารเคมี การจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนทางกายภาพนั้นยากต่อการควบคุมและการคงระดับออกซิเจนให้สม่ำเสมอ ดังนั้นการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนโดยการเติมสารเคมีจึงถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อให้การเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการทำได้ง่ายขึ้น ซึ่งวิธีการหนึ่งคือการเติมโคบอลต์คลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Wang, Hazra, Mitra, Lee, and Englander, 2000) โดยโคบอลต์คลอไรด์สามารถจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการได้โดยการคงสภาพการแสดงออกของโปรตีนที่มีชื่อว่าไฮพ็อกเซียอินดิวซิเบิลแฟกเตอร์ หรือ ฮีฟ (hypoxia inducible factor; HIF) ไม่ให้ถูกทำลายโดยออกซิเจน (Yuan, Hilliard, Ferguson, and Millhorn, 2003) รายงานการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดในสภาวะพร่องออกซิเจนยังมีไม่มากนัก แต่ก็เป็นที่ชัดเจนว่าในสภาวะพร่องออกซิเจนนั้น ฮีฟจะมีปริมาณเพิ่ม

มากขึ้น โดยโปรตีนนี้มีบทบาทสำคัญในการถอดรหัสของยีนที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนในระดับเซลล์ และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (Mohyeldin, Garzon-Muvdi, and Quinones-Hinojosa, 2010) มีการรายงานที่แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อในพินที่ระดับออกซิเจนร้อยละ 3 สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์และยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ได้ (Sakdee, White, Pagonis, and Hauschka, 2009; Iida et al., 2010) และสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของฮิฟ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของฮิฟ จะมีการลดลงของการแสดงออกของอีออกที-4 ซ็อกซ์-2 และนาอีอก (Szablowska-Gadomska, Zayat, and Buzanska, 2011)

อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาถึงผลของโคบอลต์คลอไรด์ในห้องปฏิบัติการเพื่อจำลองการเกิดสภาวะพร่องออกซิเจนที่ส่งผลต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในพินแท้ของมนุษย์ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในพินแท้ของมนุษย์ โดยพิจารณาจากการแบ่งตัวของเซลล์ การแสดงออกของยีนที่แสดงสภาวะการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

การศึกษานี้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยก่อนเริ่มการศึกษาผู้ป่วยได้รับการอธิบายและเห็นด้วยยินยอมเข้าร่วมการวิจัย โดยเซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองได้จากเนื้อเยื่อในพินแท้ของผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว จำนวน 9 คน อายุเฉลี่ย 18 ถึง 25 ปี โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 9 ชิ้น เป็นพินแท้ที่ไม่มีรอยผุและรอยโรคปลายรากฟัน ประกอบด้วยฟันกรามน้อยที่มีข้อบ่งชี้ในการถอนเพื่อการจัดฟัน

จำนวน 4 ชิ้น และฟันกรามแท้ซึ่งมีข้อบ่งชี้ในการถอนเนื่องจากได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นฟันคุดจำนวน 5 ชิ้น ภายหลังการถอนพิน เก็บพินตัวอย่างใส่ลงในหลอดพลาสติกที่มีฝาเกลียวปิดสนิท ภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

ทำความสะอาดพินด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลล์ย่นที่ปราศจากเชื้อ เพื่อกำจัดเลือดและสิ่งสกปรกออกจากตัวพิน จากนั้นดึงเนื้อเยื่อออกจากโพรงพิน นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาเจเนสชนิดที่ 1 ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Gibco, USA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องหมุนความเร็วต่ำ (Stuart Science, UK) จากนั้นนำไปหยิกที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนตกตะกอนไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงขนาด 35 มิลลิเมตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีฟีนอลเรด (Gibco, USA) ที่ผสมซีรัมจากฟิโตสวว์ร้อยละ 10 (Gibco, USA) แอลกูลูตามีน ร้อยละ 5 (Gibco, USA) และยาปฏิชีวนะร้อยละ 1 ประกอบด้วยเพนนิซิลินจีโซเดียม (Gibco, USA) และแอมโอฟเทอรีซิน บี (Gibco, USA) โดยเพาะเลี้ยงในตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน จนกระทั่งเซลล์เติบโตเต็มจานเลี้ยง เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลองเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-8

การวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงพินแท้ถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 24 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ 1×10^4 เซลล์ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ (Santa Cruz, USA) ที่มีความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์ 25 ไมโครโมลาร์และ 50 ไมโครโมลาร์ ใช้ระยะเวลาใน

การเพาะเลี้ยงเซลล์ 1 และ 3 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อครบตามกำหนดเวลานำเซลล์มาวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (Muincharern, Louwakul, Pavasant, and Lertchirakarn, 2011) โดยอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นดีเอ็มอีเอ็มชนิดที่ไม่มีฟีนอลเรด และเติมสารละลายเอ็มทีที ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma, USA) นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมดีเอ็มเอสโอปริมาณ 900 ไมโครลิตร (MERCK, Germany) และสารละลายไกลซีนบัฟเฟอร์ปริมาณ 125 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์ เขย่าให้สีของสารละลายเข้ากันและนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าบิโอมิเตอร์ (Biotek, USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นจำนวนเซลล์ตามกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากการวัดความสามารถในการเปลี่ยนเอ็มทีทีเป็นผลิตภัณฑ์มาซานของเซลล์ที่ทราบจำนวน

การวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน อ็อกซ์-4 ซ็อกซ์-2 และนาร์ก ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR)

- การเตรียมเซลล์

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันที่ถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 60 มิลลิเมตร ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ 3×10^5 เซลล์เป็นจำนวน 3 จานเลี้ยง นำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นในจานเลี้ยงที่ 1 นำมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ จานเลี้ยงที่ 2 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และจานเลี้ยงที่ 3 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

- การวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์

เมื่อครบตามกำหนดเวลาดังกล่าว ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอได้ทำตามการศึกษาที่ผ่านมา (Osathanon, Nowwarote, and Pavasant, 2011) โดยเซลล์ถูกทำลายด้วยสารละลายไตรโซล (Roche Diagnostics, USA) เพื่อเก็บอาร์เอ็นเอจากเซลล์ตามวิธีการบริษัทแนะนำ จากนั้นวัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารโปรตีนและพันธุกรรมนาโนดรอป (Thermo scientific, USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร อาร์เอ็นเอจำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่มทดลองถูกนำไปผ่านกระบวนการรีเวอร์ส ทรานสคริปเตส เพื่อสร้างคอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ (complementary DNA; cDNA) แล้วขยายสัญญาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เอนไซม์แทคโพลีเมอเรส (Invitrogen, USA) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนอ็อกซ์-4 ซ็อกซ์-2 และนาร์ก โดยใช้ซิน 18เอส (Sigma, USA) เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง (internal control) เพื่อตรวจสอบว่าปริมาณของอาร์เอ็นเอตั้งต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน สัญญาณที่ได้จากพีซีอาร์ถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยไฟฟ้าในอากาโรสเจล (Axygen Biosciences, USA) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัลนำไปอ่านค่าความเข้มด้วยโปรแกรมไซออน อิมเมจ (Scion Image-Release alpha 4.0.3.2)

การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลลาไลน์ฟอสฟาเตส

เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันที่ถูกหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลุมขนาด 24 หลุม ด้วยปริมาณเซลล์หลุมละ 1.25×10^4 เซลล์เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นในแต่ละจานเลี้ยงจะแบ่งเซลล์ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ กลุ่มที่ 2 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโกรทแฟกเตอร์ (growth factor) ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อรา

ผสมกับกรดแอสคอร์บิกที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร (Sigma, USA) เดกซามิทาโซน 100 นาโนโมลาร์ (Sigma, USA) และเบต้า กลีเซอโรฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ (Sigma, USA) (Osathanon et al., 2011) กลุ่มที่ 3 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อ แข็งผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และกลุ่มที่ 4 เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็น เซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน เมื่อครบกำหนดเวลาได้ทำการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสตามการศึกษาที่ผ่านมา (Osathanon et al., 2011) โดยทำการละลายเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer) ปริมาณ 120 ไมโครลิตร [ประกอบด้วยทริสไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (USB, USA) แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (Sigma, USA) ไตรตอนเอ็กซ์-100 ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 (USB, USA) และมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10] นำสารละลายเซลล์มาวัดปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ทำโดยผสมสารละลายเซลล์ปริมาณ 100 ไมโครลิตร กับสารละลายของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตปริมาณ 110 ไมโครลิตร [p-nitrophenyl phosphate: 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ของพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต (Invitrogen, USA) 0.1 โมลาร์ของ 2-อมีโน-2-เมธิล-1-โพรพานอล (Sigma, USA) 2 มิลลิโมลาร์ของแมกนีเซียมคลอไรด์ (Sigma, USA) และมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5] โดยพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตจะเป็นซับสเตรทของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส นำส่วนผสมนี้ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเปลี่ยนพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟตให้เป็นพาราไนโตรฟีนิล (p-nitrophenol) ที่เป็นสารที่มีสี ปฏิกริยาถูกหยุด

โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาณ 900 ไมโครลิตร (MERCK, Germany) แล้วนำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่นแสง 410 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นปริมาณเอนไซม์ (ไมโครกรัม) โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพาราไนโตรฟีนิลที่ใช้เป็นมาตรฐาน

วัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ชุดวัดโปรตีนบีซีเอ (Pierce, USA) โดยนำสารละลายเซลล์จำนวน 20 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายบีซีเอ ชนิดเอ จำนวน 1 มิลลิลิตร และชนิดบี จำนวน 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่นแสง 562 นาโนเมตร ค่าที่ได้ถูกนำไปคำนวณปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม) โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนอัลบูมินที่ใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน ค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสคำนวณเป็นสัดส่วนของปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสต่อปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในแต่ละการทดลองใช้เซลล์ที่นำมาจากฟัน 3 ซี่ (n=3) จากตัวอย่างที่ไม่ใช่บุคคลเดียวกัน โดยในแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง

การเปรียบเทียบปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนออกท์-4 ซ็อกซ์-2 และน้าน็อก ระหว่างกลุ่มศึกษา (เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ) และกลุ่มเปรียบเทียบ (เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์) โดยการวิเคราะห์เชิงพรรณนา แสดงเป็นค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบสัญญาณ โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยสัดส่วนของความเข้มของแถบสัญญาณของยีน 18เอส ของเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม

สารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่แต่ละความเข้มข้น มีค่าเป็น 1

การเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ในแต่ละกลุ่มการศึกษา แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์เนื้อเยื่อในพื้นแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลา 1 วัน มีค่าเป็น 100 และการเปรียบเทียบค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในแต่ละกลุ่มการศึกษา แสดงเป็นค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยกำหนดให้ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเนื้อเยื่อในพื้นแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์มีค่าเป็น 1 ใช้วิธีการทดสอบการแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยโปรแกรมสถิติเอสพีเอสเอส 16.0 (SPSS 16.0)

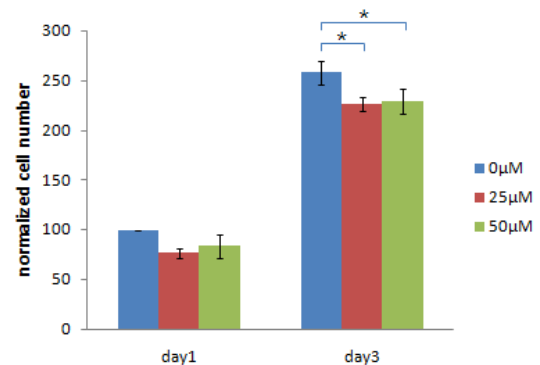
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์

ผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ พบว่าเซลล์ทั้ง 3 กลุ่ม สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยงจาก 1 และ 3 วัน แต่อย่างไรก็ตามเซลล์เนื้อเยื่อในพื้นแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ที่ระยะเวลา 3 วัน มีจำนวนของเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 1)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการโดยการเติมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีผลลดการแบ่งตัวของเซลล์เนื้อเยื่อในพื้นแท้ของมนุษย์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าโคบอลต์คลอไรด์จะไปยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลที่นำมาจากสายสะดือ เนื่องมาจากการที่โคบอลต์คลอไรด์ทำให้วงจรชีวิตของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยจะทำให้เซลล์ไปหยุดในช่วงระยะพัก

เพิ่มมากขึ้น (G0/G1 phase) และยังพบว่ามีผลลดลงของจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะแบ่งตัว (G2/S/M phase) ด้วย (Zeng et al., 2011)



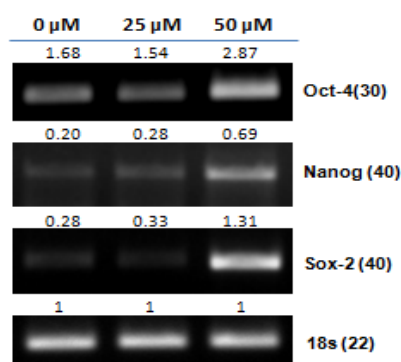
ภาพที่ 1 กราฟแสดงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่วัดด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) ของเซลล์เนื้อเยื่อในพื้นแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.25 และ 50 ไมโครโมลาร์ โดยแกนตั้งแสดงร้อยละค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์เนื้อเยื่อในพื้นแท้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลา 1 วัน มีค่าเป็น 100 และแกนนอนแสดงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (*: $p < 0.05$)

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่อาจสรุปได้ว่าสารละลายโคบอลต์คลอไรด์มีผลยังยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิด เนื่องจากผู้วิจัยทำการศึกษาโดยใช้เซลล์เนื้อเยื่อในพื้นแท้ของมนุษย์ ซึ่งประกอบด้วยเซลล์หลากหลายชนิด แต่มีจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อในพื้น (Sloan and Waddington, 2009) การศึกษาถึงผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดที่อยู่ภายในเซลล์เนื้อเยื่อในพื้นจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม โดยศึกษาถึงผลของโคบอลต์คลอไรด์ต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนสโตร-1 (STRO-1) เนื่องจากโปรตีนสโตร-1 เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ที่แสดงถึงเซลล์ต้นกำเนิดชนิด

มีเซนไคม์ที่นิยมนำมาใช้ในการระบุความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงฟันแท้ (Shi et al., 2005)

การศึกษาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนออกท์-4 ซ็อกซ์-2 และนาน็อก

การแสดงออกของยีนที่แสดงถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดนั้นก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งในการบ่งบอกถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มาจากแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกันจะมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันด้วย ในการบ่งชี้ถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันยังไม่มีการระบุอย่างแน่ชัด ในการศึกษาี้เลือกการแสดงออกของยีนออกท์-4 ซ็อกซ์-2 และนาน็อก (Kerkis et al., 2006; Avilion et al., 2003) ซึ่งยีนในกลุ่มนี้เป็นยีนที่แสดงถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (embryonic stem cell) จากการศึกษาในอดีตพบว่าสภาวะพร่องออกซิเจนส่งผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีนออกท์-4 ซ็อกซ์-2 และนาน็อกในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่ได้จากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมัน (D'Ippolito, Diabira, Howard, Roos, and Schiller, 2006; Hung, Ho, Shih, Lo, and Lee, 2012; Ranera et al., 2012)

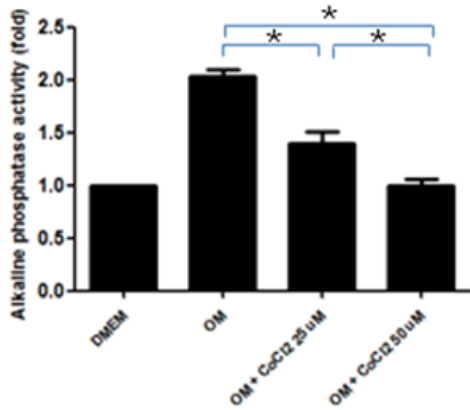


ภาพที่ 2 การแสดงออกของโปรตีนที่แสดงสถานะของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน (ตัวเลขด้านบนแสดงการอ่านค่าความเข้มด้วยโปรแกรมไซออน อิมเมจ)

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีการแสดงออกของยีนออกท์-4 ซ็อกซ์-2 และนาน็อกมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0 และ 25 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 2) ซึ่งอาจสรุปได้ว่าโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ น่าจะส่งเสริมความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากเนื้อเยื่อในฟันแท้ของมนุษย์โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีนออกท์-4 ซ็อกซ์-2 และนาน็อก แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นนั้นมาจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน หรือมาจากเซลล์ต้นกำเนิดในประชากรมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป

การศึกษาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติในการแปรสภาพไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อแข็งได้ ผู้วิจัยจึงนำเซลล์เนื้อเยื่อในฟันแท้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งที่ผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำสารละลายเซลล์มาหาค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่าการเติมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ ส่งผลค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสลดลงตามระดับโคบอลต์คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 กราฟแสดงจำนวนเท่าของค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์เนื้อเยื่อในพินแท์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ โดยแกนตั้งแสดงค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสซึ่งกำหนดให้ค่าเฉลี่ยการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเนื้อเยื่อในพินแท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์มีค่าเป็น 1 และแกนนอนแสดงการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน (DMEM: เซลล์เนื้อเยื่อในพินแท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ OM: เซลล์เนื้อเยื่อในพินแท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง OM+CoCl₂ 25 µM: เซลล์เนื้อเยื่อในพินแท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งผสมกับสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ OM+CoCl₂ 50 µM: เซลล์เนื้อเยื่อในพินแท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งผสมกับสารละลายโคบอลต์ คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ *: $p < 0.05$)

การศึกษาในเรื่องการแปรสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อในพิน พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อในพินที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับการแปรสภาพเป็นเซลล์

สร้างเนื้อเยื่อแข็งที่ผสมสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ แสดงผลการยับยั้งการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งของเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา โดยพบว่าเมื่อนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลจากไขกระดูกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็งภายใต้สภาวะพร้อมออกซิเจน มีผลในการลดความสามารถในการแปรสภาพไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง (D'Ippolito et al., 2006; Fehrer et al., 2007; Holzwarth et al., 2010) ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีระดับออกซิเจนต่ำนั้นจะเป็นการป้องกันเซลล์ต้นกำเนิดไม่ให้มีการแปรสภาพไปเป็นโปรเจเนนิเตอร์เซลล์จำเพาะ (specific progenitor cell) ซึ่งเป็นการรักษาคุณสมบัติความเป็นภาวะที่ยังไม่มีการแปรสภาพ (undifferentiated stage) ของเซลล์ต้นกำเนิดเอาไว้

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการจำลองสภาวะพร้อมออกซิเจนในห้องปฏิบัติการโดยใช้สารละลายโคบอลต์คลอไรด์เพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาวะพร้อมที่มีความคล้ายคลึงกับสภาพแวดล้อมเดิมของเซลล์ต้นกำเนิด พบว่าโคบอลต์คลอไรด์ส่งผลให้เซลล์เนื้อเยื่อในพินเพิ่มการแสดงออกของยีนที่แสดงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และการแปรสภาพเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างเนื้อเยื่อแข็ง จากผลการทดลองดังกล่าวอาจสรุปได้ว่าโคบอลต์คลอไรด์มีผลเพิ่มความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เนื้อเยื่อในพินแท์ของมนุษย์ตามความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาผลของโคบอลต์คลอไรด์ที่ส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์จากเนื้อเยื่อในพินแท์ของมนุษย์มาก่อน จึงควรศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโคบอลต์คลอไรด์กับระดับของออกซิเจน

รวมถึงกลไกของโคบอลต์คลอไรด์ที่ส่งผลต่อจำนวน และการยับยั้งการแปรสภาพของเซลล์ต้นกำเนิด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อ สนับสนุนการก่อตั้งหน่วยปฏิบัติการวิจัย (DRU)

เอกสารอ้างอิง

- Avilion, AA., Nicolis, SK., Pevny, LH., Perez L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17(1): 126-140.
- Chow, DC., Wenning, LA., Miller, WM., and Papoutsakis, ET. 2001. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J.* 81(2): 685-696.
- D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, GA., Roos, BA., and Schiller, PC. 2006. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone.* 39(3): 513-522.
- Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reitingner, S., Kloss, F., et al. 2007. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell.* 6(6): 745-757.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, PG., and Shi, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(25): 13625-13630.
- Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, LW., Cherman, N., Boyde, A., et al. 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 81(8): 531-535.
- Guzy, RD., and Schumacker, PT. 2006. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* 91(5): 807-819.
- Holzwarth, C., Vaegler, M., Gieseke, F., Pfister, SM., Handgretinger, R., Kerst, G., et al. 2011. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol.* 11: 11.
- Hung, SP., Ho, JH., Shih, YR., Lo, T., and Lee, OK. 2012. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 30(2): 260-266.
- Iida, K., Takeda-Kawaguchi, T., Tezuka, Y., Kunisada, T., Shibata, T., and Tezuka, K. 2010. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Arch Oral Biol.* 55(9): 648-654.
- Kerkis, I., Kerkis, A., Dozortsev, D., Stukart-Parsons, GC., Gomes Massironi, SM., Pereira, LV., et al. 2006. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* 184(3-4): 105-116.
- Koyama, N., Okubo, Y., Nakao, K., and Bessho, K. 2009. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg.* 67(3): 501-506.

- Kozam, G. 1967. Oxygen tension of rabbit incisor pulp. *J Dent Res.* 46(2): 352-358.
- Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T., and Quinones-Hinojosa, A. 2010. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 7(2): 150-161.
- Muincharern, W., Louwakul, P., Pavasant, P., and Lertchirakarn, V. 2011. Effect of fluocinolone acetonide on human dental pulp cells: cytotoxicity, proliferation, and extracellular matrix formation. *J Endod.* 37(2): 181-184.
- Osathanon, T., Nowwarote, N., and Pavasant, P. 2011. Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLCgamma signaling pathway. *J Cell Biochem.* 112(7): 1807-1816.
- Ranera, B., Remacha, AR., Alvarez-Arguedas, S., Romero, A., Vazquez, FJ., Zaragoza, P., et al. 2012. Effect of hypoxia on equine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *BMC Vet Res.* 8: 142.
- Sakdee, JB., White, RR., Pagonis, TC., and Hauschka, PV. 2009. Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells. *J Endod.* 35(6): 818-823.
- Shi, S., Bartold, P. M., Miura, M., Seo, B. M., Robey, P. G., and Gronthos, S. 2005. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontics & Craniofacial Research.* 8(3): 191-199.
- Sloan, AJ., and Waddington, RJ. 2009. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent.* 19(1): 61-70.
- Szablowska-Gadomska, I., Zayat, V., and Buzanska, L. 2011. Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 71(1): 86-93.
- Wang, G., Hazra, TK., Mitra, S., Lee, HM., and Englander, EW. 2000. Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl₂ in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic Acids Res.* 28(10): 2135-2140.
- Whalen, WJ., Ganfield, R., and Nair, P. 1970. Effects of breathing O₂ or O₂ + CO₂ and of the injection of neurohumors on the PO₂ of cat cerebral cortex. *Stroke.* 1(3): 194-200.
- Yu, CY., Boyd, NM., Cringle, SJ., Alder, VA., and Yu, DY. 2002. Oxygen distribution and consumption in rat lower incisor pulp. *Arch Oral Biol.* 47(7): 529-536.
- Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., and Millhorn, DE. 2003. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem.* 278(18): 15911-15916.
- Zeng, HL., Zhong, Q., Qin, YL., Bu, QQ., Han, XA., Jia, HT., et al. 2011. Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biol.* 12:32.