ว ทันต จุฬาฯ 2549;29:63-74
CU Dent J. 2006;29:63-74

บทวิทยาการ
Original Article

ฟลูออไรด์กระตุ้นการเจริญของเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ผ่านทางพี 38 ไคเนส

กฤษณ์ชัย เบศรภิญโญวงศ์ ท.บ., วท.ม.[1]
ประสิทธิ์ ภวสันต์ ท.บ., Ph.D[1]

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ รวมทั้งกลไกการทำงานของฟลูออไรด์ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์โพรงฟัน

วัสดุและวิธีการ ทดสอบผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อการแบ่งตัวของเซลล์โพรงฟันโดยใช้วิธีการวิเคราะห์โดยการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู และการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที หลังจากนั้นจะกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์ร่วมกับการใส่สารยับยั้งแมปไคเนสชนิดต่างๆ ผลการทดลองจะถูกวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว

ผลการศึกษา พบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 พีพีเอ็มขึ้นไปจะมีพิษต่อเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ ($p < 0.05$) แต่ในทางกลับกัน ฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 พีพีเอ็มกลับมีผลในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์โพรงฟันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยกลไกการกระตุ้นน่าจะผ่านทางพี 38 ไคเนส เนื่องจากตัวยับยั้ง พี 38 ไคเนส สามารถยับยั้งผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์

สรุป ฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 พีพีเอ็มขึ้นไปจะมีพิษต่อเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ ในขณะที่ฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 พีพีเอ็มเพิ่มอัตราการเจริญของเซลล์ โดยมีการกระตุ้นผ่านทางพี 38 ไคเนส

(ว ทันต จุฬาฯ 2549;29:63-74)

คำสำคัญ เซลล์โพรงฟัน; พี 38 ไคเนส; ฟลูออไรด์

บทนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าฟลูออไรด์เป็นสารที่มีประโยชน์ในแง่ของการเสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่กระดูกและฟันและช่วยป้องกันฟันผุ[1] ผลของฟลูออไรด์ต่อเนื้อเยื่ออนินทรีย์ (mineralized tissue) ทั้งในกระดูกและฟันเกิดจากการที่ฟลูออไรด์สามารถเข้าแทนที่ไฮดรอกซีไอออน (hydroxy ion) ในผลึกไฮดรอกซีอาปาไทต์ (hydroxyapatite;$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) เกิดเป็นผลึกฟลูออโรอาปาไทต์ (fluoroapatite;$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$) ซึ่งมีความเสถียรและทนทานต่อการกัดกร่อนของกรดมากกว่าผลึกไฮดรอกซีอาปาไทต์[2]

สารประกอบฟลูออไรด์ที่นิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรมมีหลายรูปแบบ ตั้งแต่ในรูปของโซเดียมฟลูออไรด์ (sodium fluoride), สแตนนัสฟลูออไรด์ (stannous fluoride) หรือ แอซิดูเลตฟอสเฟตฟลูออไรด์ (acidulated phosphate fluoride, APF) โดยใช้ทั้งในรูปแบบของการให้ฟลูออไรด์เฉพาะที่ เช่น น้ำยาบ้วนปากผสมฟลูออไรด์ (fluoride mouthwash), ยาสีฟันผสมฟลูออไรด์ (fluoride toothpaste) และฟลูออไรด์เจล (fluoride gel) สำหรับการเคลือบฟันในทางทันตกรรมป้องกัน หรือการให้ฟลูออไรด์ทางระบบ โดยใช้ในรูปแบบที่เป็นเม็ด (tablets), สารละลายหยด (drops), เกลือฟลูออไรด์ (fluoridated salt) หรือนมผสมฟลูออไรด์ (fluoridated milk) สำหรับรับประทาน นอกจากนี้ในหลายๆ ประเทศก็ได้มีการเติมฟลูออไรด์ลงไปในน้ำประปาด้วย (water fluoridation) โดยมีความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่ 1 พีพีเอ็ม ซึ่งก็พบว่าช่วยลดอัตราการเกิดโรคฟันผุของประชาชนลงได้

ฟลูออไรด์ที่ปรากฏอยู่ในร่างกายคนเรานั้น 99% จะอยู่ที่กระดูกและฟัน ส่วนพลาสมา (plasma) จะมีฟลูออไรด์ทั้งที่เป็นรูปไอออน (ionic form) และรูปที่ไม่ใช่ไอออน (non-ionic form) รวมกันเป็นปริมาณฟลูออไรด์รวมในพลาสมา (total plasma fluoride) ซึ่งโดยปกติจะพบได้ในปริมาณระหว่าง 0.7 ถึง 2.4 ไมโครโมลาร์ (micromolar) ซึ่งจัดว่าเป็นระดับที่ปกติ สำหรับฟลูออไรด์ในน้ำลายจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.01-0.05 พีพีเอ็ม หรือประมาณ 2 ใน 3 ของฟลูออไรด์ในพลาสมา[3-7]

สำหรับผลทางด้านชีวภาพของฟลูออไรด์ พบว่าฟลูออไรด์มีผลต่ออัตราการเจริญ (proliferation), ผลต่อกระบวนการดิฟเฟอเรนชิเอชั่น (differentiation), ผลต่อการสร้างโปรตีนและผลต่อการเหนี่ยวนำการเกิดตะกอนอนินทรีย์ (calcification) ในเนื้อเยื่ออนินทรีย์ได้[8] และจากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าฟลูออไรด์สามารถกระตุ้นการเจริญในเซลล์กระดูกและเซลล์โพรงฟัน รวมทั้งกระตุ้นการแสดงออกของเซลล์ด้านอื่นๆ ด้วย เช่น การเพิ่มระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase)[9-12] และการเพิ่มการสร้างเส้นใยคอลลาเจน (collagen) เป็นต้น[13-14]

เซลล์โพรงฟันเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างและซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน โดยเซลล์เหล่านี้ยังสามารถดิฟเฟอเรนชิเอท (differentiate) เป็นเซลล์สร้างเนื้อฟันได้เมื่อมีอันตรายเกิดขึ้นกับฟันหรือเนื้อเยื่อโพรงฟัน[15] ปัจจุบันการศึกษาถึงผลของฟลูออไรด์ต่อเนื้อเยื่อโพรงฟันยังมีอยู่น้อยมาก โดยพบเพียงรายงานของ Nakade และคณะ[12] และ Thaweeboon และคณะ[16] ที่แสดงว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 2 พีพีเอ็มและที่ความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม มีผลในการกระตุ้นการเจริญและเพิ่มระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ได้ จากผลของรายงานดังกล่าวบ่งชี้ถึงศักยภาพของฟลูออไรด์ ในการเสริมสร้างการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อโพรงฟัน อย่างไรก็ดี น่าจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเฉพาะในแง่ของความเข้มข้น และกลไกการทำงานของฟลูออไรด์ เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงของฟลูออไรด์ อาจมีผลเสียต่อเนื้อเยื่อโพรงฟันได้ โดยพบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 25 พีพีเอ็มสามารถไปยับยั้งการสร้างเส้นใยคอลลาเจน, ลดระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสลง และมีผลลดการเจริญของเซลล์ด้วย[16-17] นอกจากนี้ในทางคลินิกเองก็ได้มีการใช้วัสดุแก้วไอโอโนเมอร์ (glass ionomer) ที่ใช้เป็นวัสดุอุดรองพื้น (lining or capping materials) ในการบูรณะฟัน ซึ่งตัววัสดุมีคุณสมบัติในการปล่อยฟลูออไรด์ในความเข้มข้นต่ำออกมาได้[18-19] ฟลูออไรด์ที่หลุดออกมาจากซีเมนต์ที่แข็งตัวแล้ว ส่วนมากมาจากฟลูออไรด์ไอออนในเมทริกซ์ โดยจะอยู่ในรูปของโซเดียมฟลูออไรด์, แคลเซียมฟลูออไรด์หรือฟลูออไรด์ไอออนอิสระ ในระยะแรกๆ ฟลูออไรด์จะหลุดออกมาจากผิวหน้าของซีเมนต์ หลังจากนั้นฟลูออไรด์ที่อยู่ใต้ผิวหน้าจะเคลื่อนที่ไปยังชั้นผิวหน้าและถูกปลดปล่อยออกมา[20-21] ปริมาณฟลูออไรด์ที่ปลดปล่อยจะมีปริมาณสูงสุดใน 24 ชั่วโมงแรก (ประมาณ 4.3 พีพีเอ็ม) แล้วจะลดลงเรื่อยๆจนคงที่ (ประมาณ 1 พีพีเอ็ม) ใน 1-2 อาทิตย์[22-23] ทำให้เนื้อฟันและเนื้อเยื่อโพรงฟันสามารถ

ได้รับฟลูออไรด์เพิ่มขึ้นด้วย และอาจมีผลต่อกระบวนการซ่อมแซมที่เกิดขึ้นได้

เนื่องจากยังไม่มีรายงานวิจัยใดที่ศึกษากลไกการทำงานในระดับเซลล์ของฟลูออไรด์ในเซลล์โพรงฟัน การศึกษาในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ในแง่ของอัตราการเจริญ รวมทั้งศึกษากลไกการทำงานของฟลูออไรด์ในระดับเซลล์ ซึ่งความเข้าใจในบทบาทของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อโพรงฟัน น่าจะช่วยให้เกิดความเข้าใจในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟัน อันจะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย และการนำเอาฟลูออไรด์ไปประยุกต์ใช้ในการกระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อโพรงฟันในอนาคตต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมเซลล์สำหรับใช้ในการทดลอง

เนื้อเยื่อโพรงฟันที่ใช้ศึกษาจะได้จากฟันกรามซี่ที่ 3 (third molar) จากขากรรไกรบนหรือขากรรไกรล่างที่ถอนฟันด้วยเหตุผลทางทันตกรรมจัดฟันหรือด้วยเหตุผลอื่นๆ ฟันที่ได้จะต้องมีสภาพสมบูรณ์ปกติ ไม่มีโรคฟันผุ ไม่มีโรคของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน และไม่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ จากผู้ป่วยช่วงอายุ 18-25 ปีที่มารับการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้ให้ผู้ป่วยลงนามในเอกสารยินยอมการนำฟันไปใช้ และใช้ฟันจากผู้ป่วยอย่างน้อย 3 คน นำฟันมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายด์ (phosphate-buffered saline: PBS) ที่ปราศจากเชื้อ 3-4 ครั้ง จากนั้นจึงแบ่งฟันออกเป็น 2 ส่วนตามแนวยาวด้วยสิ่วและค้อน จากนั้นจึงใช้ปากคีบขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อดึงเนื้อเยื่อโพรงฟันออกมาใส่ในภาชนะที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ ใช้มีดสะอาดตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดประมาณ 1-2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วนำไปวางเรียงในจานเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish; Nunc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ให้มีปริมาณชิ้นเนื้อประมาณ 5-9 ชิ้นต่อหนึ่งจานและวางอยู่ห่างกัน 4-5 มิลลิเมตร อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อโพรงฟันคือ ดีเอ็มอีเอ็ม ที่เติมซีรั่ม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ 10, 2 มิลลิโมลาร์กลูตา-มีน (2 mM L-glutamine), ยาปฏิชีวนะ (antibiotics: 10,000 units/ml penicillin และ 10,000 μg/ml streptomycin sulphate) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotic: 25 μg/ml amphotericin B)

อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุก 2 วันจนเซลล์โพรงฟันเคลื่อนออกจากชิ้นเนื้อและเจริญจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะถูกถ่าย (subculture) ไปยังจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ด้วยเอนไซม์ทริพซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA) และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 โดยในการทดลองจะใช้เซลล์รุ่นที่ 3-5 อาหารเลี้ยงเซลล์และสารประกอบทั้งหมดจะได้จากบริษัท Gibco BRL ประเทศสหรัฐอเมริกา

การทดสอบผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟัน

วิธีการศึกษาจะเริ่มด้วยการหว่านเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุมเป็นเวลา 16 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรั่มร้อยละ 10 จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่ม 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะทิ้งไว้นาน 3 ชั่วโมง การทดสอบความเป็นพิษของฟลูออไรด์จะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่มีซีรัมที่มีฟลูออไรด์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 10 ถึง 100 พีพีเอ็ม (ppm) และทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง สำหรับการทดสอบผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์จะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่มีซีรัมที่มีฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แล้วกระตุ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำซ้ำกันทั้งหมด 3 ชุด

หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจสอบวัดปริมาณของเซลล์ โดยในการศึกษาครั้งนี้จะทดสอบหาจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู (Methylene blue) และการใช้สารเอ็มทีที (MTT) จากบริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา

การวิเคราะห์จำนวนเซลล์โดยการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู

เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด เซลล์จะถูกคงสภาพ (fix) ด้วยสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 4 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (borate buffer) หลายๆ ครั้ง แล้วย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ละลายสีที่ย้อมติดเซลล์ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) และเอทิลอัลกอฮอลล์

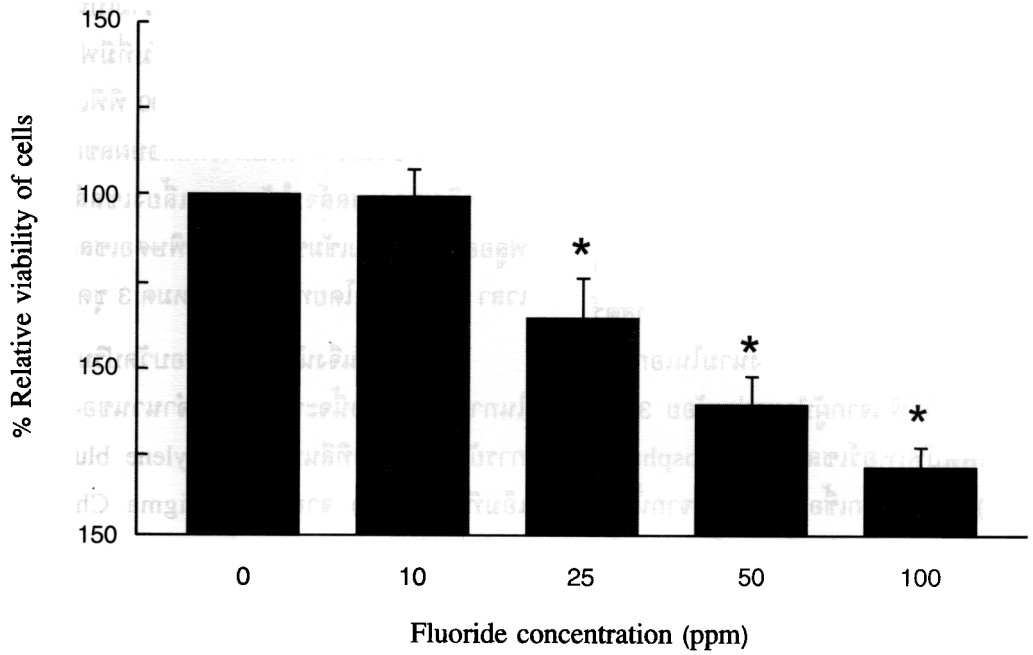
(ethyl alcohol) แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 667 นาโนเมตร (nm) และเปรียบเทียบผลกับกราฟมาตรฐานที่ทำขึ้นโดยใช้เซลล์ที่ทราบจำนวนแน่นอน เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์

การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วยสารเอ็มทีที

เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มีฟีนอลเรด (phenol red) และเติมสารละลายเอ็มทีที (MTT) ลงไป หลังจากนั้นอีก 1 ชั่วโมงจึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วละลายผลึกฟอร์มาแซน (formazan) ที่เกิดขึ้นในจานเลี้ยงเซลล์ด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) กับไกลซีนบัฟเฟอร์ (glycine buffer) จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปวัดผลด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (nm) และเปรียบเทียบผลกับกราฟมาตรฐานที่ทำขึ้นโดยใช้เซลล์ที่ทราบจำนวนแน่นอน เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์

การศึกษากลไกการทำงานของฟลูออไรด์

วิธีการศึกษาจะเริ่มด้วยการหว่านและกระตุ้นเซลล์เช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น สารยับยั้ง (inhibitor) แมปไคเนส (MAPK; mitogen activated protein kinase) 3 ชนิดคือ เอิร์ค (ERKs; extracellularsignal-regulated kinases), พี 38 ไคเนส (p38 kinase) และจูนไคเนส (JNK; Jun N-terminal kinase) จากบริษัท Calbiochem ประเทศเยอรมนี จะถูกเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ชั่วโมง ก่อนการกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์ และวัดจำนวนเซลล์หลังจากนั้น 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิคเอ็มทีที



รูปที่ 1 กราฟแสดงความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ด้วยการย้อมสีเมทิลีนบลู จำนวนเซลล์คำนวณเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และปริมาณของเซลล์แสดงผลเป็นร้อยละเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่คิดเป็นร้อยละ 100

* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

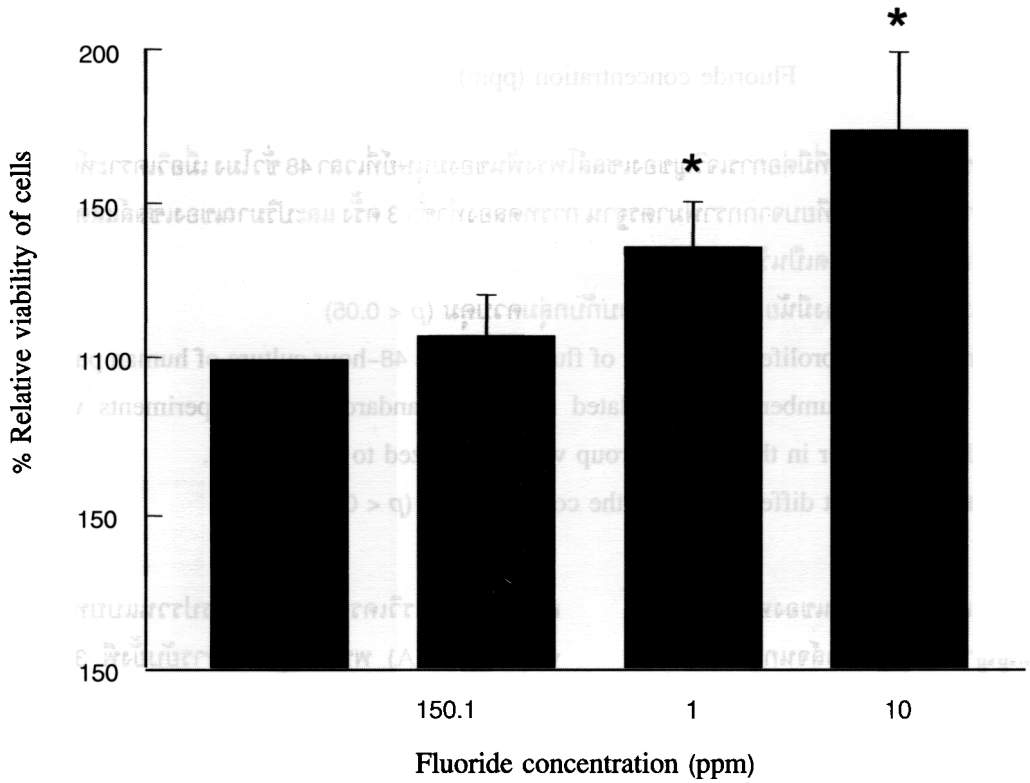
Figure 1 Graph demonstrated the toxic concentration of fluoride on the 24-hour culture of human pulp cells using Methylene blue assay. The cell number was calculated from the standard curve. Experiments were done in triplicate and cell number in the control group was normalized to 100 percent.

* Demonstrate significant difference from the control group ($p < 0.05$).

ผลการศึกษา

จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบความเป็นพิษของฟลูออไรด์ด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 พีพีเอ็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่ม ปริมาณเซลล์ที่ย้อมติดสีเมทิลีนบลูเมื่อเทียบให้เซลล์ในกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 100 แสดงไว้ในรูปที่ 1 และเมื่อทดสอบทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way ANOVA) พบว่าจำนวนเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 25, 50 และ 100 พีพีเอ็ม แสดงว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 พีพีเอ็มขึ้นไปจะมีพิษต่อเซลล์โพรงฟัน

รูปที่ 2A และ 2B เป็นการทดสอบผลของฟลูออไรด์ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์โพรงฟันด้วยการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู (รูปที่ 2A) และการทดสอบด้วยเทคนิคเอ็มทีที (รูปที่ 2B) โดยกระตุ้นเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 พีพีเอ็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่มเช่นเดียวกับข้างต้น เมื่อทดสอบทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way ANOVA) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 1 และ 10 พีพีเอ็ม ในการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู และที่ความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 10 พีพีเอ็ม ในการใช้เทคนิคเอ็มทีที แสดงว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม มีผลในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์โพรงฟัน

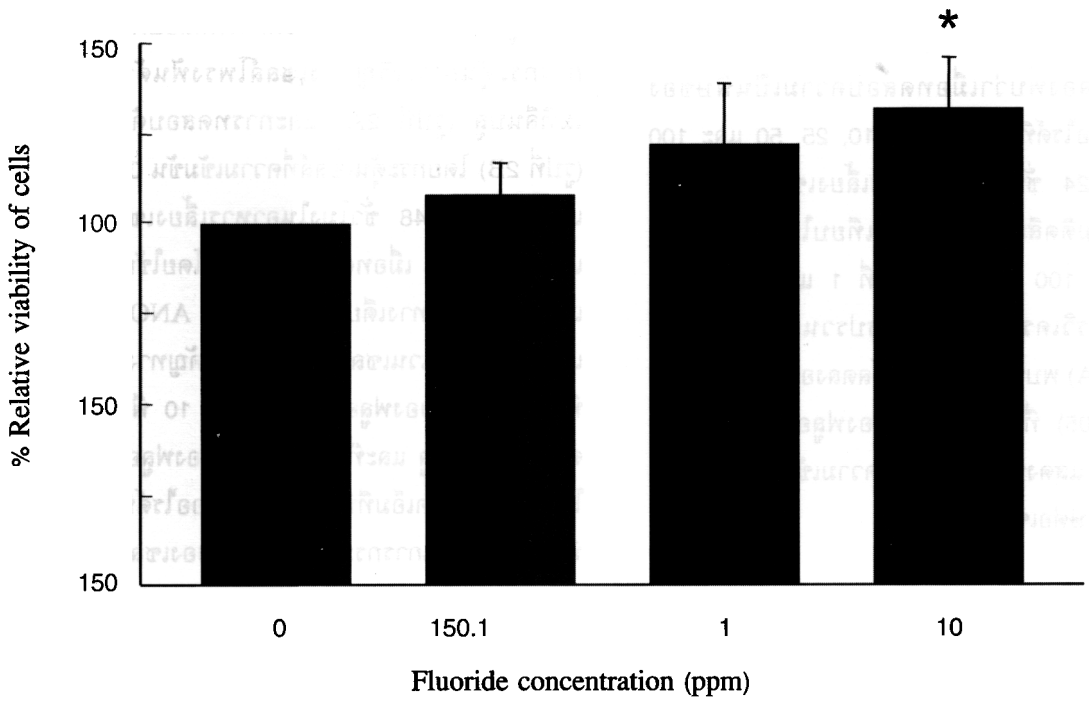


รูปที่ 2A กราฟแสดงผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ด้วยการย้อมสีเมทิลีนบลู จำนวนเซลล์คำนวณเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และปริมาณของเซลล์แสดงผลเป็นร้อยละเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่คิดเป็นร้อยละ 100

* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

Figure 2A Graph demonstrated the proliferative effect of fluoride on the 48-hour culture of human pulp cells using Methylene blue assay. The cell number was calculated from the standard curve. Experiments were done in triplicate and cell number in the control group was normalized to 100 percent.

* Demonstrate significant difference from the control group ($p < 0.05$).



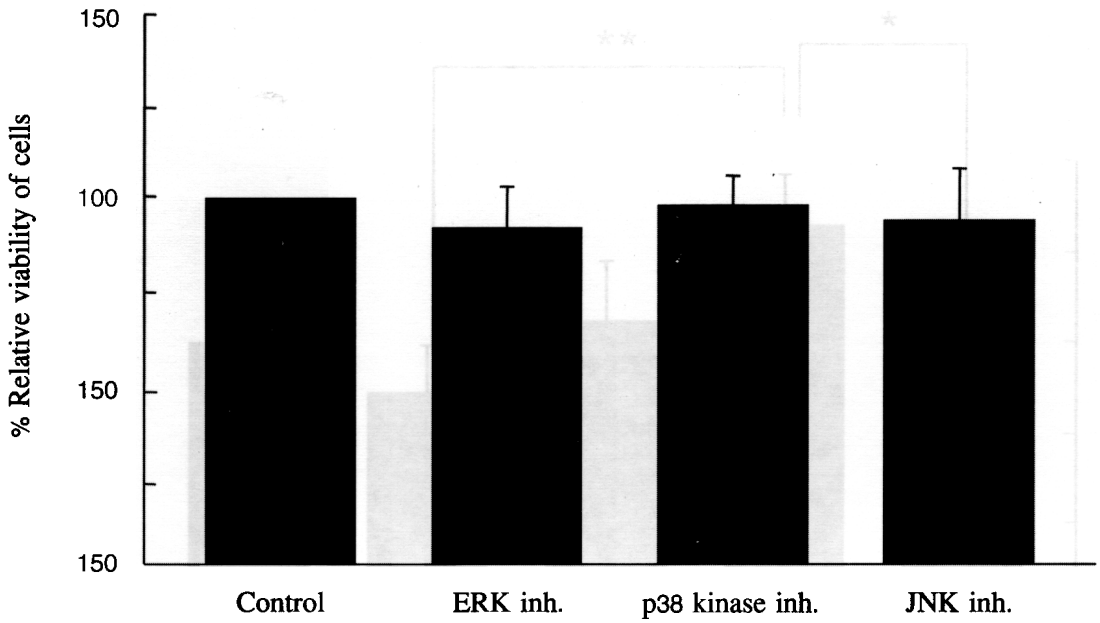
รูปที่ 2B กราฟแสดงผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อการเจริญของเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที จำนวนเซลล์คำนวณเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และปริมาณของเซลล์แสดงผลเป็นร้อยละเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่คิดเป็นร้อยละ 100

* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

Figure 2B Graph demonstrated the proliferative effect of fluoride on the 48-hour culture of human pulp cells using MTT assay. The cell number was calculated from the standard curve. Experiments were done in triplicate and cell number in the control group was normalized to 100 percent.

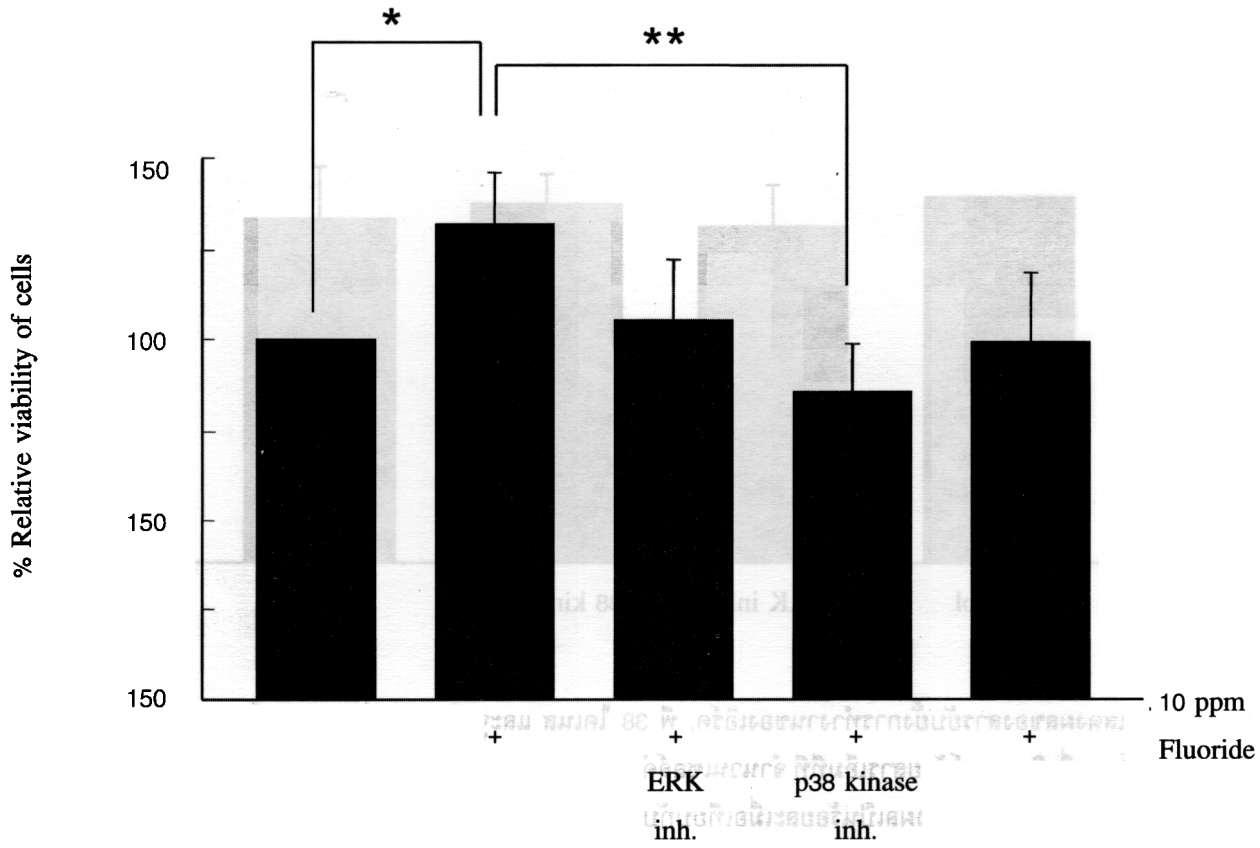
* Demonstrate significant difference from the control group ($p < 0.05$).

ส่วนผลการศึกษาถึงกลไกการกระตุ้นของฟลูออไรด์ว่ามีบทบาทต่อการกระตุ้นสัญญาณภายในเซลล์จนกระทั่งเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์โพรงฟันได้อย่างไร โดยทดสอบในกลุ่มที่ได้รับฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม และกลุ่มที่ได้รับฟลูออไรด์ร่วมกับสารยับยั้งแมปไคเนส 3 ชนิดด้วยกันคือ เอิร์ค, พี 38 ไคเนส และจูนไคเนส พบว่ามีปริมาณเซลล์ที่ย้อมติดสีสารเอ็มทีทีเป็นร้อยละ 123.08±14.05, 105.4±16.61, 85.43±13.08 และ 99.21±19.09 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่คิดเป็นร้อยละ 100 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way ANOVA) พบว่ากลุ่มที่ใส่สารยับยั้งพี 38 ไคเนสเพียงกลุ่มเดียว ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม ดังแสดงผลในรูปที่ 3B ส่วนในรูป 3A เป็นการทดลองเพื่อแสดงให้เห็นว่า การใส่เฉพาะสารยับยั้งแมปไคเนสทั้ง 3 ชนิดลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรั่ม ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์โพรงฟันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 3A กราฟแสดงผลของสารยับยั้งการทำงานของเอิร์ค, พี 38 ไคเนส และจูนไคเนส ที่มีต่อเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที จำนวนเซลล์คำนวณเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และปริมาณของเซลล์แสดงผลเป็นร้อยละเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่คิดเป็นร้อยละ 100

Figure 3A Graph demonstrated the effect of the inhibitors of ERK, p38 kinase and JNK on the 48-hour culture of non-stimulated human pulp cells using MTT assay. The cell number was calculated from the standard curve. Experiments were done in triplicate and cell number in the control group was normalized to 100 percent.



รูปที่ 3B กราฟแสดงผลของสารยับยั้งการทำงานของเอิร์ค, พี 38 ไคเนส และจูนไคเนส ที่มีต่อเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็มที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที จำนวนเซลล์คำนวณเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และปริมาณของเซลล์แสดงผลเป็นร้อยละเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่คิดเป็นร้อยละ 100

* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม กับกลุ่มที่ใส่สารยับยั้งแมปไคเนส ($p < 0.05$)

Figure 3B Graph demonstrated the effect of ERK, p38 kinase and JNK inhibitors on the proliferative human pulp cells which stimulated by 10 ppm fluoride for 48 hours using MTT assay. The cell number was calculated from the standard curve. Experiments were done in triplicate and cell number in the control group was normalized to 100 percent.

* Demonstrate significant difference from the control group ($p < 0.05$).

** Demonstrate significant difference between the group only activated by 10 ppm Fluoride and MAPK inhibitor ($p < 0.05$).

วิจารณ์

ในปัจจุบันการศึกษาถึงผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟันยังคงไม่มีความชัดเจน เนื่องจากมีรายงานจำนวนไม่มากนักที่ศึกษาถึงการตอบสนองของเซลล์โพรงฟันต่อฟลูออไรด์และแสดงให้เห็นว่าผลของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟันจะแปรผันตามความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่ใช้กระตุ้นเซลล์[12,17,24]

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้ 2 เทคนิคในการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ โดยวิธีการวัดปริมาณเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมสี

เมทิลีนบลูที่เสนอโดย Oliver และคณะ[25] ซึ่งจะเป็นการย้อมโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตบนผิวเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามอาจมีข้อจำกัดบางประการในแง่ของปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการวัด โดยพบว่าการย้อมสีด้วยสีเมทิลีนบลูจะให้ผลแสดงปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ในปริมาณน้อยได้ไม่ชัดเจน นอกจากนี้ข้อเสียอีกประการหนึ่งของสีเมทิลีนบลูคือการย้อมติดโมเลกุลที่มีประจุลบ ดังนั้นสีอาจย้อมติดเซลล์ที่ได้รับอันตรายจากสารที่ทดสอบ แต่ยังไม่สูญเสียคุณสมบัติในการยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์ หรืออาจย้อมติดโปรตีนบางชนิดที่เซลล์สร้างขึ้น ทำให้การแปลผลคลาดเคลื่อนได้

สำหรับวิธีวัดปริมาณเซลล์อีกวิธีที่ค่อนข้างเป็นที่ยอมรับกัน คือการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที โดยวิธีนี้จะวัดหาจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เนื่องจากเซลล์เหล่านั้นจะสามารถใช้เอนไซม์ดีไฮโดรจิเนสในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการหายใจระดับเซลล์ในการเปลี่ยนเตตระโซเลียมซอลท์ (tetrazolium salt) ในสารเอ็มทีทีให้กลายเป็นผลึกฟอร์มาแซนสีม่วง[26] ซึ่งเมื่อนำไปละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสม ก็จะสามารถนำไปวัดหาปริมาณเซลล์ได้ สารเอ็มทีทีมีข้อดีในกรณีที่ปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการวัดมีอยู่ในปริมาณน้อย โดยจะสามารถแสดงผลปริมาณเซลล์ได้ชัดเจน[27] อย่างไรก็ตาม ยังคงมีข้อจำกัดบางประการสำหรับการวัดผลด้วยสารเอ็มทีที ดังเช่นมีรายงานที่กล่าวว่าความจำเพาะ (specific activity) ของสารเอ็มทีทีได้รับอิทธิพลจากหลายปัจจัย เช่น ชนิดของเซลล์ ความเข้มข้นของสารเอ็มทีทีที่ใช้ ปัญหาอีกประการหนึ่งคือ สารละลายที่ได้จากผลึกฟอร์มาแซนจะมีความคงตัวในระยะเวลาอันสั้น[27] ดังนั้นถ้าวัดผลในช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสม อาจทำให้ได้ผลที่คลาดเคลื่อนได้

สำหรับผลการทดลองเพื่อหาระดับความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟัน ภายหลังการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 10 ถึง 100 พีพีเอ็มในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรั่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 พีพีเอ็มขึ้นไปจะมีพิษต่อเซลล์โพรงฟัน ซึ่งผลการทดสอบความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่ได้นี้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Veron และคณะ[17] ซึ่งพบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็มมีผลในการยับยั้งการสร้างเส้นใยคอลลาเจน, ลดระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและลดอัตราการเจริญของเซลล์ลง และในการทดลองของ Chang and Chou[24] ก็พบว่าฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 38 พีพีเอ็มขึ้นไปมีพิษต่อเซลล์โพรงฟันโดยจะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์, การแบ่งตัวของเซลล์, การทำงานของไมโตคอนเดรียรวมถึงการสร้างโปรตีนด้วย

งานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่าฟลูออไรด์ในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 พีพีเอ็ม สามารถเพิ่มอัตราการเจริญได้ในเซลล์โพรงฟันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยทำการวัดผลหลังจากที่กระตุ้นไปได้ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมเนื่องจากเซลล์จะผ่านพ้นระยะการแบ่งตัวแบบไมโตซิส (mitosis) ได้พอดี ซึ่งผลที่ได้คล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Nakade และคณะ[12] และ Thaweboon และคณะ[16] ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟลูออไรด์น่าจะมีส่วนส่งเสริมในกระบวนการหายของแผล

การศึกษาในส่วนนี้ ใช้การวัดจำนวนเซลล์ทั้งสองวิธีเพื่อยืนยันซึ่งกันและกัน และพบว่าฟลูออไรด์สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์โพรงฟันได้ เมื่อวัดด้วยทั้งสองเทคนิค แต่จะให้ค่าต่างกันเล็กน้อย คือเทคนิคการย้อมเมทิลีนบลูจะให้ให้ผลทั้งที่ 1 และ 10 พีพีเอ็ม ในขณะที่เทคนิคเอ็มทีที จะให้ผลที่ 10 พีพีเอ็มเท่านั้น ความแตกต่างนี้ อาจเนื่องจากผลของฟลูออไรด์ที่สามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนด้วย ทำให้การติดสีเมทิลีนบลูเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจากการวัดปริมาณโปรตีนของผู้วิจัยก็พบว่าเพิ่มขึ้น (ไม่ได้แสดงผลไว้) โดยผลของฟลูออไรด์ต่อการสร้างโปรตีนนี้ กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาเพิ่มเติม

สำหรับกลไกการกระตุ้นของฟลูออไรด์ที่มีต่ออัตราการเจริญของเซลล์นั้นยังไม่เคยมีรายงาน แต่จากการศึกษาในเซลล์กระดูกพบว่าฟลูออโรอลูมิเนต (fluoroaluminate) สามารถกระตุ้นผ่านจี-โปรตีน (G-protein) ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อยที่ต่างกัน (heterotrimeric subunits) โดยฟลูออโรอลูมิเนตจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปจับกับหน่วยย่อยจี-อัลฟาที่ไม่พร้อมทำงาน (inactive G alpha protein subunit) โดยจับอยู่ในตำแหน่งถัดจากจีดีพี (GDP) เกิดเป็นกลุ่มของโครงสร้างที่เรียกว่าจี-อัลฟา-จีดีพี-ฟลูออโรอลูมิเนต (G alpha-GDP-AlF4 complex) และสามารถส่งผ่านสัญญาณเข้าสู่เซลล์ได้ ในเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) ฟลูออโรอลูมิเนตจะกระตุ้นโปรตีนจี-อัลฟา ไอ (G alpha i proteins) นำไปสู่การลดระดับของไซคลิกเอเอ็มพี (cAMP)

และกระตุ้นแมปไคเนส และพี 70 เอส 6 ไคเนส (p70 S6 kinase) ซึ่งการกระตุ้นผ่านแมปไคเนส ทำให้เซลล์มีการเพิ่มอัตราการแบ่งตัวสูงขึ้น[28-31] แต่ในกรณีของเซลล์โพรงฟันยังไม่มีรายงานวิจัยที่ทำการศึกษา ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาไปถึงกลไกการกระตุ้นในระดับเซลล์ว่าฟลูออไรด์ไปมีบทบาทต่อการกระตุ้นสัญญาณภายในเซลล์ผ่านทางเส้นทางใดจนทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์โพรงฟันได้ โดยพบว่าการใส่สารยับยั้งพี 38 ไคเนส สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์โพรงฟันแตกต่างจากกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็มเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่การใส่สารยับยั้งเอิร์คและสารยับยั้งจูนไคเนสมีผลในการยับยั้งเช่นเดียวกัน แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็มเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่ากลไกของฟลูออไรด์ในการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์เพื่อไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวนั้น น่าจะผ่านทางพี 38 ไคเนส

สรุป

ฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25 พีพีเอ็มขึ้นไปจะมีพิษต่อเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ ในขณะที่ฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 พีพีเอ็มเพิ่มอัตราการเจริญของเซลล์ โดยมีการกระตุ้นผ่านทางพี 38 ไคเนสในการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช สำหรับหน่วยปฏิบัติการวิจัยเนื้อเยื่ออนินทรีย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้วิจัยขอขอบคุณ น.ส. ภัสสร วรรณพินิจ และ น.ส. กนกพร เลิศสิริรังสรรค์ นักวิทยาศาสตร์ประจำหน่วยปฏิบัติการวิจัย สำหรับความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Leverett DH. Fluorides and the changing prevalence of dental caries. Science. 1982;217: 26-30.
2. Aoba T. The effect of fluoride on apatite structure and growth. Crit Rev Oral Biol Med. 1997;8: 136-53.
3. Singer L, Ophaug RH. Concentrations of ionic, total, and bound fluoride in plasma. Clin Chem. 1979;25:523-5.
4. Newbrun E. Fluorides and dental caries. 3rd ed. Thomas CC, editor. Springfield Illinois USA, 1986:185.
5. Ehrnebo M, Ekstrand J. Occupational fluoride exposure and plasma fluoride levels in man. Int Arch Occup Environ Health. 1986;58:179-90.
6. Oliveby A, Lagerlof F, Ekstrand J, Dawes C. Influence of flow rate, pH and plasma fluoride concentration on fluoride concentration in human parotid saliva. Arch Oral Biol. 1989;34:191-4.
7. Ferjerskov O, Ekstrand J, Burt BA. Fluoride in dentistry. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard, 1996:59.
8. Robinson C, Kirkham J. The effect of fluoride on the developing mineralized tissue. J Dent Res. 1990;69 (Spec Iss):685-91.
9. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and ALP activity of bone forming cells. Science. 1983;222:330-2.
10. Wergedal JE, Lau K-HW, Baylink DJ. Fluoride and bovine bone extract influence cell proliferation and phosphatase activity in human bone cell cultures. Clin Orthop Rel Res. 1988;233:274-82.
11. Khokher MA, Dandona P. Fluoride stimulates [3H] thymidine incorporation and alkaline phosphatase production by human osteoblasts. Metabolism. 1990;39:1118-21.
12. Nakade O, Koyama H, Arai J, Takada J, Kaku T. Stimulation by low concentration of fluoride of the proliferation and alkaline phosphatase activity of human dental pulp cells in vitro. Arch Oral Biol. 1999;44:89-92.
13. Lau K-HW, Yoo A, Wang SP. Aluminum stimulates the proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro by a mechanism that is different from fluoride. Mol Cell Biolchem. 1991;

105:93-105.

14. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. 1,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. J Bone Miner Res. 1993;8:1453-8.
15. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and influences of various matrices with reference to pulp wound healing. J Dent Res. 1985;64:530-40.
16. Thaweboon S, Thaweboon B, Chunhabundit P, Suppukpatana P. Effect of fluoride on human dental pulp cells in vitro. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003;34:915-8.
17. Veron MH, Couble ML, Magloire H. Selective inhibition of collagen synthesis by fluoride in human pulp fibroblasts in vitro. Calcif Tissue Int. 1993;53:38-44.
18. Forsten L. Short and long-term fluoride release from glass ionomers and other fluoride containing filling materials in vitro. Scand J Dent Res. 1990;98: 179-85.
19. Tam LE, Chan GP-L, Yim D. In vitro caries inhibition effects by conventional and resin-modified glass-ionomer restorations. Operative Dentistry. 1997;22:4-14.
20. Thylstrup A, Fejerskov O. Textbook of cariology. Copenhagen: Munksgaard, 1986:193-194.
21. Katsuyama S, Ishikawa T, Fujii B. Glass ionomer dental cement. St. Loius : Ishiyaku EuroAmerica Publisher, 1993:53-96.
22. Momoi Y, McCabe SF. Fluoride release from light-activated glass ionomer restorative cements. Dent Mater. 1993;9:151-4.
23. Mitra SB. In vitro fluoride release from a light-cured glass ionomer liner/base. J Dent Res. 1991;70:75-8.
24. Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;91: 230-4.
25. Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ and Laurent GJ. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assassment of growth factors. J Cell Sci. 1989;92:513-8.
26. Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 3rd ed. New York:Wiley-Liss,Inc., 1994.
27. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65:55-63.
28. Susa M. Heterotrimeric G proteins as fluoride targets in bone (review). Int J Mol Med. 1999;3: 115-26.
29. Lau K-HW, Baylink DJ. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells. J Bone Miner Res. 1998;13:1660-7.
30. Caverzasio J, Imai T, Ammann P, Burgener D, Bonjour JP. Aluminum potentiates the effect of fluoride on tyrosine phosphorylation and osteoblast replication in vitro and bone mass in vivo. J Bone Miner Res. 1996;11:46-55.
31. Caverzasio J, Palmer G, Suzuki A, Bonjour JP. Mechanism of the mitogenic effect of fluoride on osteoblast-like cells: evidences for a G protein-dependent tyrosine phosphorylation process. J Bone Miner Res. 1997;71:1249-54.

Fluoride promotes human pulp cell proliferation through p38 kinase pathway

Kritchai Bespinyowong D.D.S. M.S.[1]
Prasit Pavasant D.D.S. Ph.D[1]

[1] Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Abstract

Objective To study the effects of fluoride on cell proliferation in cultured human pulp cells and investigate the mechanism of fluoride on cell proliferation.

Materials and methods Effect of fluoride on cell proliferation was analysed by methylene blue and MTT assay. For determining the intracellular pathway, cells were treated with fluoride in the presence of MAPK inhibitors. The results were statistically analysed by using One-way Analysis of Variance.

Results The cytotoxic effect of fluoride on human pulp cells was observed at $\geq$ 25 ppm ($p < 0.05$). In contrast, 1 and 10 ppm of fluoride significantly stimulated dental pulp cell proliferation ($p < 0.05$). The proliferative effect of fluoride may occur through p38 kinase since the inhibitor of p38 kinase inhibited fluoride-induced dental pulp cell proliferation.

Conclusion Fluoride concentration higher than 25 ppm has cytotoxic effect on human pulp cells, whereas fluoride at 1 and 10 ppm promote human pulp cell proliferation via p38 kinase.

(CU Dent J. 2006;29:63-74)

Key words: *fluoride; p38 kinase; pulp cells*