

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.07.008

FGF-23(R176Q)过表达对成年小鼠下颌骨形成和矿化的影响*

刘洪¹, 孙雯², 郑阳玉^{3△}

(1. 盐城卫生职业技术学院口腔医学技术教研室, 江苏盐城 224005; 2. 南京医科大学解剖学系 210029; 3. 南京医科大学口腔医学研究所 210029)

[摘要] 目的 研究 FGF-23(R176Q)过表达对成年小鼠下颌骨形成和矿化的影响。方法 使用 CT 扫描、血清学检查、HE 染色、免疫组织化学法染色和 RT-PCR 等方法分析 FGF-23(R176Q)转基因小鼠(TG 组)和野生型小鼠(WT 组)下颌骨, 比较血清钙、磷浓度变化和颌骨骨基质和矿化的差异。结果 WT 组小鼠血清钙、磷和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 浓度均明显高于 TG 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); TG 组的成骨细胞密度低于 WT 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); TG 组的二聚糖阳性百分比高于 WT 组, 而 DSP 阳性百分比低于 WT 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); WT 组的 OCN 和 I 型胶原 mRNA 表达水平均明显高于 TG 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 FGF-23(R176Q)过表达能够抑制下颌骨骨基质的形成, 减少骨质的矿化, 进而导致了下颌骨发育障碍。

[关键词] FGF-23; 过表达; 矿化; 骨基质

[中图分类号] R780.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)07-0888-03

The effective of FGF-23(R176Q) overexpress in adult mouse mandible formation and mineralization*

Liu Hong¹, Sun Wen², Zheng Yangyu^{3△}

(1. Department of Stomatology Technology, Yancheng Health Vocational and Technical College, Yancheng, Jiangsu 224005, China; 2. Department of Anatomy, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 3. Institute of Stomatology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effective of FGF-23(R176Q) overexpression of adult mouse mandible formation and mineralization. **Methods** CT scanning, serological examination, HE staining, immunohistochemical staining and RT-PCR analysis were used to compared mandible of FGF-23(R176Q) transgenic mice(TG group) and wild type mice(WT group), serum calcium and phosphorus concentrations mandibule formation and mineralization were analysed. **Results** Serum calcium, phosphorus and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concentrations in WT group were significantly higher than that in TG group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the Ob. s/B. Pm TG group was lower than that of WT group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the positive percentage of Biglycan in TG group was higher than that in WT group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the OCN and type I collagen mRNA levels in the WT group were significantly higher than that in TG group, the difference were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** FGF-23(R176Q) overexpression can inhibit the formation of mandible, reduce the formation of mineralized, and reduce the development of the mandible.

[Key words] FGF-23; overexpression; mineralization; bone matrix

常染色体显性遗传低磷性佝偻病(autosomal-dominant hypophosphatemic rickets, ADHR)^[1]是一种常见的佝偻病。导致 ADHR 的主要原因在于 FGF-23(R176Q)错义突变后无法被蛋白水解酶水解, 导致 FGF-23 在体内蓄积, 肾脏磷酸盐回收不足导致磷酸盐尿, 肾脏 1-羟化酶(1- α -hydroxylase, 1-ase)的合成被抑制, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 合成减少^[2]。利用转基因的手段将错义突变的人 FGF-23 基因转入小鼠, 构建 ADHR 的小鼠动物模型 FGF-23(R176Q)转基因小鼠。表型分析发现, FGF-23(R176Q)转基因小鼠表现出发育缓慢、肌张力降低、手足搐搦、凶门闭合不全等佝偻病的症状, 与 ADHR 患者的症状基本一致^[3]。但是, FGF-23(R176Q)过表达对下颌骨的形成、矿化是否有影响, 目前, 未见有相关报道。本研究利用 8 周龄的 FGF-23(R176Q)转基因小鼠和同窝的野生型小鼠, 通过 X 线扫描、组织学等手段进行观察, 试图阐明 FGF-23

(R176Q)对小鼠下颌骨形成和矿化是否有影响以及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用同窝的 8 周龄野生型(wild type, WT)小鼠和 FGF-23(R176Q)转基因小鼠各 15 只, 雌雄不限, 饲养于无特殊病原体级动物房, 使用常规饮食(1.0% 钙, 0.5% 磷)进行饲养。

1.2 动物基因型鉴定及分组 剪取 1 mm 长鼠尾, 使用酚-氯仿-异戊醇法进行 DNA 的提取, 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)进行小鼠基因型的鉴定。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行凝胶电泳, 在紫外灯下进行观察。根据基因型的结果分为 TG 组和 WT 组, PCR 电泳结果有 436 bp 条带者为 FGF-23(R176Q)小鼠, 无条带者为 WT 小鼠^[4]。

1.3 血清学检查 小鼠使用乙醚进行麻醉,麻醉后固定于动物台上,使用 1 mL 注射器进行心脏采血,4 ℃ 下以 2 000 r/min 离心 10 min,抽取上层血清,使用放射免疫法进行血清钙、磷和 1,25(OH)₂D₃ 浓度检测。

1.4 取材 解剖分离小鼠的左侧下颌骨并免疫电镜固定液固定,采用乙二胺四乙酸(EDTA)法脱钙 2 周,脱水包埋,按照下颌第 1 磨牙近中根根管方向对下颌骨进行横断面切片,切片厚度 5 μm。解剖分离小鼠的左侧下颌骨,使用 75% 乙醇固定,进行 CT 检查。

1.5 CT 检查 使用 SkyScan 1072 scanner 扫描仪对 75% 乙醇固定的小鼠下颌骨进行扫描检查,扫描电压 100 kV,电流 98 mA,通过 CT 检查观察两组小鼠的下颌骨骨密度变化情况。

1.6 染色观察

1.6.1 总胶原染色 石蜡切片脱蜡水化,用配制好的苦味酸直红染色液孵育 1 h,流水冲洗 5 min,苏木精染色 10 min,梯度乙醇脱水,透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

1.6.2 二聚糖免疫组织化学染色 石蜡切片使常规脱蜡水化,用 5% 正常兔血清封闭 20 min,分别加入羊抗鼠二聚糖一抗(1:500,美国 Santa Cruz 公司),4 ℃ 孵育过夜,PBST 清洗,加兔抗羊 IgG 二抗(1:200,美国 Sigma 公司),室温孵育 30 min;PBST 清洗,加 Elite-ABC(英国 Vector 公司)孵育 30 min,PBS 清洗,加 DAB 溶液(英国 Vector 公司)室温避光孵育 5~8 min,苏木精复染 1 min,常规脱水透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察摄片,计算聚糖在下颌骨中的阳性面积比例。

1.6.3 HE 染色 石蜡切片使常规脱蜡水化,苏木素染色 10 min,流水冲洗后使用伊红染色 30 s,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,在光学显微镜下测量 2 种不同基因型小鼠下颌骨成骨细胞密度(Ob. s/B. Pm)。

1.7 骨钙素(osteocalcin,OCN)和 I 型胶原 mRNA 表达水平检测 解剖小鼠的下颌磨牙,一步法提取总 RNA,常规方法进行逆转录,利用 real time RT-PCR 方法检测下颌骨的 OCN 和 I 型胶原(type I collagen)基因的表达水平。OCN 正向引物序列为:5'-CAA GTC CCA CAC AGC AGC TT-3',反向引物序列为:5'-AAA GCC GAG CTG CCA GAG TT-3',产物 370 bp,I 型胶原正向引物序列为:5'-TCT CCA CTC TTC TAG TTC CT-3',反向引物序列为:5'-TTG GGT CAT TTC CAC ATG C-3',产物 269 bp,使用 Applied biosystems 7300 型实时定量 RT-PCR 仪扩增并进行统计分析实验结果,以 WT 组的表达量作为参照。

1.8 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析,组间单因素方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

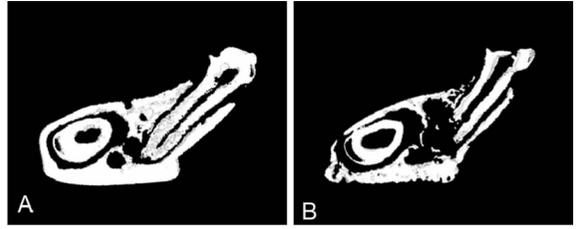
2 结 果

2.1 血清学指标检查 WT 组小鼠血清钙、磷和 1,25(OH)₂D₃ 浓度均明显高于 TG 组,而 WT 组的 PTH 的浓度低于 TG 组,差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 两组小鼠血清学指标检查(̄x±s)

组别	钙(mg/L)	磷(mg/L)	1,25(OH) ₂ D ₃ (pg/mL)
WT 组	110.78±14.69	98.22±20.57	154.78±36.25
TG 组	96.54±11.21	54.21±16.21	58.21±14.57
t	2.98	6.51	9.57
P	<0.05	<0.05	<0.05

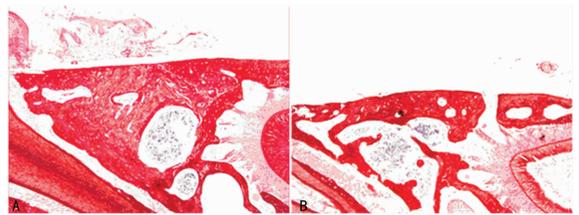
2.2 CT 检查结果 CT 的检查结果显示,而 TG 组颌骨 X 线阻射程度低于 WT 组小鼠,并且 TG 组下颌第 1 磨牙有龋坏发生(图 1)。



A:WT 组;B:TG 组。

图 1 2 种小鼠 CT 扫描

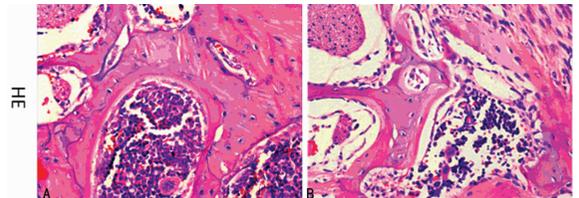
2.3 总胶原染色结果 WT 组下颌骨相对骨量为(68.56±19.65)%;TG 组下颌骨相对骨量为(38.14±14.29)%,TG 组的下颌骨相对骨量低于 WT 组,差异有统计学意义(t=4.85,P<0.05),见图 2。



A:WT 组;B:TG 组。

图 2 2 种小鼠总胶原染色结果(×200)

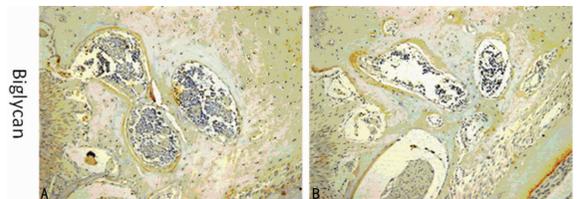
2.4 HE 染色结果 通过对 HE 染色结果进行统计分析,结果发现,WT 组成骨细胞密度(26.24±7.56)/mm,而 TG 组为(14.68±6.89)/mm,WT 组成骨细胞密度高于 TG 组,差异有统计学意义(t=4.38,P<0.05),见图 3。



A:WT 组;B:TG 组。

图 3 2 种小鼠 HE 染色结果(×400)

2.5 免疫组织化学染色结果 通过对 TG 组和 WT 组的 DSP 和聚糖免疫组织化学阳性百分比进行统计分析,结果发现 WT 组的聚糖阳性百分比为(6.52±1.28)%,TG 组为(12.68±2.54)%,TG 组高于 WT 组,差异有统计学意义(t=8.39,P<0.05),见图 4。



A:WT 组;B:TG 组。

图 4 2 种小鼠聚糖免疫组织化学染色结果(×400)

2.6 ALP 和 I 型胶原 mRNA 表达水平检测 通过使用 RT-PCR 检测 TG 组和 WT 组 OCN 和 I 型胶原 mRNA 表达水平,结果发现 WT 组的 OCN 和 I 型胶原 mRNA 表达水平均

明显高于 TG 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组小鼠 OCN 和 I 型胶原 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	OCN	I 型胶原
WT 组	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.17
TG 组	0.56 ± 0.11	0.76 ± 0.13
<i>t</i>	8.78	4.34
<i>P</i>	<0.05	<0.05

3 讨 论

本研究发现 TG 组小鼠的血清钙、磷和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的浓度均低于 WT 组小鼠,并且差异有统计学意义($P < 0.05$)。其原因在于体内过高浓度突变的 FGF-23 抑制 1-羟化酶的活性,导致 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的合成减少,同时减少肾脏、小肠对钙和磷的重吸收,从而导致了血清钙、磷浓度降低^[5]。

CT 扫描结果表明,TG 组小鼠的下颌骨 X 线透光率明显高于 WT 组小鼠,表明 TG 小鼠下颌骨存在矿化障碍,这个研究结果与对 1-羟化酶敲除小鼠研究结果基本一致^[6]。同时,总胶原染色结果显示 TG 组小鼠的下颌骨骨量明显低于 WT 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时,HE 染色结果也发现 TG 组的单位长度上的成骨细胞数目也明显少于 WT 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。上述研究结果表明,FGF-23 (R176Q) 过表达导致了成骨细胞减少,进而影响了下颌骨的骨基质的形成和矿化。此外,二聚糖的免疫组织化学结果也提示 FGF-23 (R176Q) 过表达导致了二聚糖在下颌骨中的表达增加。聚糖仅在未矿化的组织中如前期牙本质、未矿化类骨质表达^[7],矿化完成后二聚糖即被分解,而高浓度的二聚糖能够抑制矿化过程的持续进行^[8]。本研究同样表明,当 FGF-23 (R176Q) 过表达时,二聚糖在下颌骨骨基质的蛋白沉积水平增加,表明其下颌骨骨基质中未矿化的基质比例明显增加,由此导致了下颌骨矿化障碍。

此外,FGF-23 (R176Q) 转基因小鼠下颌骨的 OCN 和 I 型胶原 mRNA 表达水平均明显低于 WT 小鼠,表明 FGF-23 (R176Q) 过表达抑制了下颌骨成骨细胞的 OCN 和 I 型胶原 mRNA 表达。研究表明,OCN 能够促进羟基磷灰石晶体的形成和沉积^[9],能促进牙齿和骨骼的矿化^[10-11],而 I 型胶原是骨骼的主要胞外基质,在骨质的形成中起到无机质矿化的框架作用^[12]。作者研究发现,FGF-23 (R176Q) 在体内过表达一方面导致抑制了下颌骨成骨细胞 I 型胶原的合成,导致了下颌骨的胞外基质分泌减少,另外一方面导致了下颌骨成骨细胞 OCN 合成减少,导致了下颌骨矿化出现异常。

本研究发现,FGF-23 (R176Q) 转基因小鼠下颌骨出现了骨质疏松、矿化不良等表型,与作者以前研究的 1-羟化酶基因敲除小鼠的下颌骨的表型^[13-15] 较为相似,其主要原因在于 FGF-23 (R176Q) 过表达抑制了 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的合成,同时还导致了低钙、低磷血症,并且还导致下颌骨成骨细胞密度下降,减少了 OCN 和 I 型胶原 mRNA 表达水平,阻碍了下颌骨胞外基质的合成与分泌和矿化过程的进行,最终阻碍了下颌骨的正常发育和矿化。

参考文献

[1] ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophospha-

taemic rickets is associated with mutations in FGF-23 [J]. *Nat Genet*, 2000, 26(3): 345-348.

- [2] Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, et al. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(11): 4957-4960.
- [3] Bai X, Miao D, Li J, et al. Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(11): 5269-5279.
- [4] 刘洪, 孙雯, 郑阳玉. FGF-23 (R176Q) 过表达对成年小鼠磨牙龋损的影响 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2014, 30(3): 322-326.
- [5] Liu P, Bai X, Wang H, et al. Hypophosphatemia-mediated hypotension in transgenic mice overexpressing human FGF-23 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(4): H1514-1520.
- [6] 刘洪, 杨留才, 苗登顺. $1,25$ 二羟维生素 D_3 缺乏对小鼠继发性牙本质生成、矿化和龋损的影响 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2010, 28(6): 599-602, 606.
- [7] Bae CH, Lee JY, Kim TH, et al. Excessive Wnt/ β -catenin signaling disturbs tooth-root formation [J]. *J Periodontol Res*, 2013, 48(4): 405-410.
- [8] Haruyama N, Sreenath TL, Suzuki S, et al. Genetic evidence for key roles of decorin and biglycan in dentin mineralization [J]. *Matrix Biol*, 2009, 28(3): 129-136.
- [9] 刘红, 廖二元, 伍贤平. 骨钙素与代谢性骨病 [J]. *国外医学: 内分泌学分册*, 2004, 24(4): 239-240, 249.
- [10] Sun W, Sun W, Liu J, et al. Alterations in phosphorus, calcium and PTHrP contribute to defects in dental and dental alveolar bone formation in calcium-sensing receptor-deficient mice [J]. *Development*, 2010, 137(6): 985-992.
- [11] 叶凌, 李江宁, 李联钦, 等. 骨钙素在体内的表达 [J]. *国外医学: 口腔医学分册*, 2002, 29(4): 228-229.
- [12] 刘洪, 苗登顺. $1-\alpha$ 羟化酶基因敲除导致小鼠牙本质形成和前期牙本质矿化障碍 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2008, 28(8): 985-989, 1002.
- [13] 刘洪, 高瑞乡, 杨留才, 等. 内源性 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 缺乏对哺乳期小鼠牙齿矿化和牙本质形成的影响 [J]. *口腔医学研究*, 2011, 27(7): 575-579.
- [14] 刘洪, 丁风云, 颜成东, 等. $1,25$ 二羟维生素 D_3 在小鼠下颌骨矿化作用机制研究 [J]. *口腔生物医学*, 2011, 2(3): 131-135, 139.
- [15] 刘洪, 王子露, 王琰玲, 等. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 缺乏对小鼠下颌骨体及髁突骨形成的影响 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2011, 27(5): 597-602.

(收稿日期: 2014-10-21 修回日期: 2014-12-11)