

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.29.006

甲状旁腺素相关肽蛋白核定位序列及 C 末端缺失 对小鼠下颌磨牙发育的影响^{*}

刘 洪, 颜成东, 蒋尚飞
(江苏医药职业学院医学技术学院, 江苏盐城 224005)

[摘要] **目的** 研究甲状旁腺素相关肽(PTHrP)核定位序列和 C-末端在小鼠下颌磨牙中的作用。**方法** 选取野生型(WT)小鼠(WT 组)和 PTHrP Knock-in 小鼠(PTHrP KI 组)各 10 只,使用 CT 扫描三维重建、苏木精-伊红(HE)、免疫组织化学染色等方法分析 PTHrP KI 小鼠和 WT 小鼠的下颌第一磨牙的差异。**结果** WT 组小鼠的下颌第一磨牙明显长于 PTHrP KI 组小鼠,前期牙本质占总牙本质比例明显小于 PTHrP KI 组小鼠,差异均有统计学意义($P<0.01$);WT 组小鼠Ⅰ型胶原(Collagen-Ⅰ)、牙本质涎蛋白(DSP)和 Ki-67 阳性比例明显高于 PTHrP KI 组小鼠,而 p27 阳性比例低于 PTHrP KI 组小鼠,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** PTHrP 核定位序列和 C-末端缺失导致小鼠磨牙牙本质细胞外基质分泌减少,矿化障碍。**[关键词]** 甲状旁腺素相关肽;核定位序列;C 末端;磨牙;发育;矿化
[中图法分类号] R780.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)29-3748-04

The influence of absence of parathyroid hormone-related peptide nuclear localization sequence and C-terminal on the development of mandibular molars in mice^{*}
LIU Hong, YAN Chengdong, JIANG Shangfei
(Department of Medical Technology, Jiangsu Vocational College of Medicine, Yancheng, Jiangsu 224005, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) nuclear localization sequence and C-terminal on mice mandibular molars. **Methods** A total of 10 wild-type (WT) mice (WT group) and 10 PTHrP Knock-in mice (PTHrP KI group) were selected. The difference of the mandibular first molar between mice in the PTHrP KI group and mice in the WT group was detected by CT three-dimensional reconstruction, HE staining and immunohistochemical staining. **Results** The length of mandibular first molar of mice in the WT group was significantly longer than that of mice in the PTHrP KI group, while the percentage of predentin in total dentin was significantly smaller than that of mice in the PTHrP KI group, and the differences were statistically significant ($P<0.01$). In addition, the positive proportion of Collagen-Ⅰ, DSP and Ki-67 of mice in the WT group were significantly higher than those of mice in the PTHrP KI group, while the positive proportion of p27 was lower than that of mice in the PTHrP KI group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Absence of PTHrP nuclear localization sequence and C-terminal could lead to the reduction of secretion of extracellular matrix in molar dentin and disturbance of mineralization in mice.
[Key words] parathyroid hormone related peptide; nuclear localization sequence; C-terminal; molar; development; mineralization

甲状旁腺素相关肽(parathyroid hormone related peptide, PTHrP)的结构和作用均和甲状旁腺素(PTH)相类似^[1]。PTHrP 和 PTH 有相同的受体,并且 PTHrP 通过自分泌/旁分泌方式发挥多种生理功能^[2]。PTHrP 的 N-末端(1~36)和 PTH 的功能基本相同;而 PTHrP 核定位序列(87~106)和 C-末端共同通过细胞内分泌的方式达到促进细胞增殖的功能^[3]。为了研究 PTHrP 核定位序列及 C 末端的功能,利用基因工程在 PTHrP 的第 84 位氨基酸序列后敲入一个终止密码 TGA,制备了不表达 PTHrP 核定位序列及 C-末端的小鼠模型,称为 PTHrP Knock-in (PTHrP KI)小鼠。这种小鼠的表型有生存时间变短,以及骨骼、脑组织和皮肤发育不良等表现^[4]。为了研究 PTHrP 核定位序列及 C 末端缺失对小鼠下颌

^{*} 基金项目:盐城市医学科技发展计划项目(YK2016049)。 作者简介:刘洪(1975—),副教授,硕士,主要从事口腔颌面部发育方面的研究。

磨牙发育是否存在影响,本研究利用出生后 2 周的 PTHrP KI 小鼠和野生型小鼠的下颌磨牙进行比较,研究 PTHrP 核定位序列及 C 末端缺失对小鼠下颌磨牙发育和矿化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 使用雄性 PTHrP KI 杂合子小鼠和雌性 PTHrP KI 杂合子小鼠交配(小鼠购自江苏省实验动物中心),获得同窝的野生型(wild type, WT)小鼠和 PTHrP KI 纯合子(PTHrP KI)仔鼠。仔鼠由母鼠喂养,母鼠使用普通饲料进行喂养。待小鼠生长至 2 周后取材,WT 小鼠(WT 组)和 PTHrP KI 小鼠(PTHrP KI 组)分别取 10 只进行后续的影像学、组织学和分子生物学实验。本次实验经江苏医药职业学院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 动物基因型鉴定 小鼠出生后剪取鼠尾,使用蛋白酶 K 进行消化,提取 DNA 后利用 PCR 进行目标片段扩增反应,产物使用 BstE II 内切酶进行酶切反应后行琼脂糖凝胶电泳,WT 小鼠条带为 424 bp,PTHrP KI 小鼠条带为 258 bp 和 166 bp^[5]。

1.2.2 取材 WT 小鼠和 PTHrP KI 小鼠生长至 2 周后,颈椎脱臼处死,解剖分离左右两侧下颌骨,使用免疫电镜固定液固定后行 CT 扫描,使用乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙后石蜡包埋,切片。

1.2.3 影像学检查 使用 SkyScan 1072 scanner CT 扫描仪对 WT 小鼠和 PTHrP KI 小鼠下颌骨进行扫描,通过 CT 检查观察,沿着下颌第一磨牙近中根管方向进行三维重建。

1.2.4 苏木精-伊红(HE)染色 石蜡切片分别使用 100%、75%和 50%乙醇进行脱蜡,苏木精染色 8 min,伊红染色 2 min,分别使用 50%、75%、100%乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。在光学显微镜下观察放大 100 倍 HE 染色切片,测量两种小鼠下颌第一磨牙长度,放大 400 倍 HE 染色切片测量两种小鼠的下颌第一磨牙前期牙本质占总牙本质的比例。

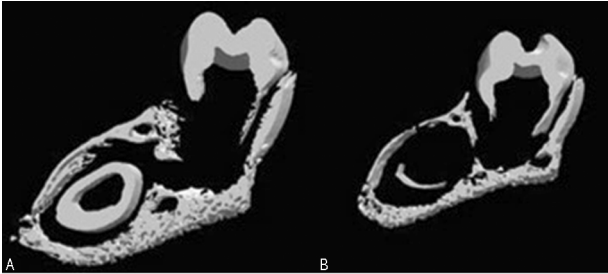
1.2.5 免疫组织化学检查 石蜡切片使用牛睾丸透明质酸酶消化,I 型胶原(Collagen-I)一抗为免抗鼠多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司生产),二抗为生物素标记的羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz 公司生产),使用生物素-亲和素-桥联碱性磷酸酶酶标法(ABC-AP,美国 Vector 公司生产)孵育,碱性磷酸酶染色液染色后使用甲基绿复染。牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein,DSP)、Ki-67 和 p27 一抗均为免抗多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司生产),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz 公司生产),链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(Elite-AP,美国 Vector 公司生产)孵育后使用二氨基联苯胺(DAB)染色液染色,DSP 使用苏木精复染。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行统

计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

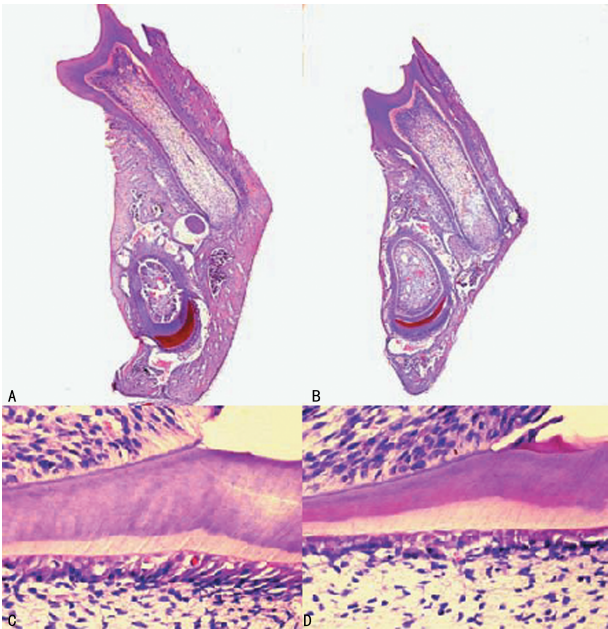
2.1 影像学检查 Micro-CT 扫描三维重建结果显示,PTHrP KI 组小鼠的下颌第一磨牙牙根长度明显小于 WT 组小鼠,见图 1。



A: WT 组小鼠;B: PTHrP KI 组小鼠

图 1 两组小鼠 CT 扫描和三维重建

2.2 HE 染色 WT 组小鼠的下颌第一磨牙长度较 PTHrP KI 组小鼠长,差异有统计学意义($t = 6.109$, $P < 0.01$);WT 组小鼠的前期牙本质占总牙本质比例小于 PTHrP KI 组小鼠,差异有统计学意义($t = 9.178$, $P < 0.01$),见图 2、表 1。



A: WT 组小鼠下颌骨($\times 100$);B: PTHrP KI 组小鼠下颌骨($\times 100$);C: WT 组小鼠下颌第一磨牙牙颈部($\times 400$);D: PTHrP KI 组小鼠下颌第一磨牙牙颈部($\times 400$)

图 2 两组小鼠 HE 染色

表 1 两组小鼠下颌第一磨牙长度和前期牙本质占总牙本质比例比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	下颌第一磨牙长度(mm)	前期牙本质占总牙本质比例(%)
WT 组	10	1.54 $\pm$ 0.21	22.43 $\pm$ 2.57
PTHrP KI 组	10	1.03 $\pm$ 0.16	40.34 $\pm$ 5.61
<i>t</i>		6.109	9.178
<i>P</i>		<0.01	<0.01

表 2 两组小鼠下颌第一磨牙 Collagen- I、DSP、Ki-67 和 p27 阳性表达比较(̄x±s,%)

组别	n	Collagen- I 占 下颌第一磨牙阳性比例	DSP 占 牙本质阳性比例	Ki-67 阳性 细胞比例	p27 阳性细胞比例
WT 组	10	38.75±5.89	2.53±0.42	22.14±3.13	10.53±2.35
PTHrP KI 组	10	29.76±5.13	1.13±0.21	11.34±1.87	23.57±6.87
t		3.559	9.428	6.743	8.716
P		0.002 2	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 免疫组织化学染色 WT 组小鼠 Collagen- I 占下颌第一磨牙阳性比例、Ki-67 阳性细胞比例和 DSP 占牙本质阳性比例均高于 PTHrP KI 组小鼠,p27 阳性细胞比例低于 PTHrP KI 组小鼠,差异均有统计意义($P<0.05$),见图 3、表 2。

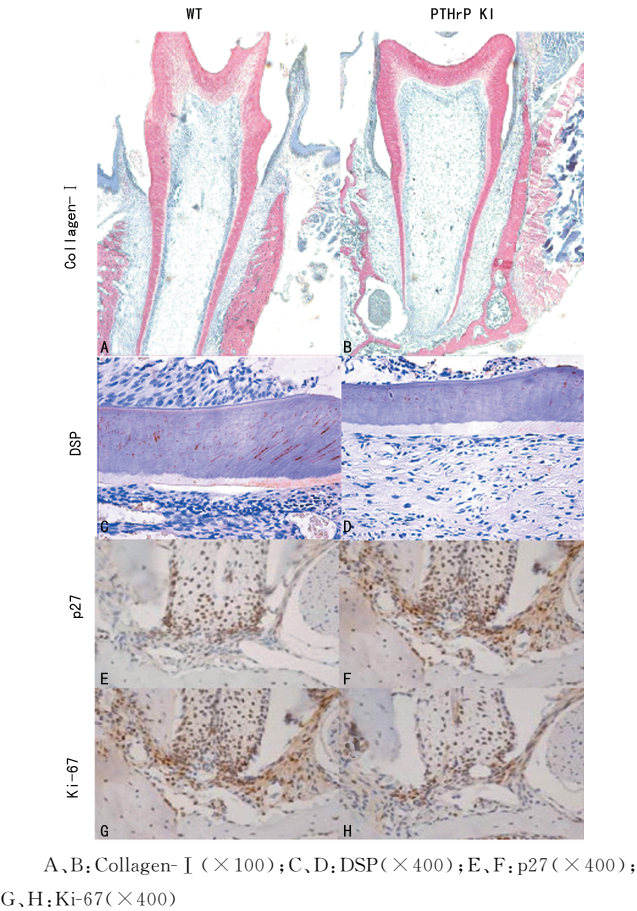


图 3 两组小鼠磨牙中 Collagen-I、DSP、Ki-67 和 p27 阳性表达

3 讨 论

在牙齿的发育、萌出和矿化过程中,多种钙、磷调节激素如 1,25(OH)₂D₃^[6]、成纤维细胞生长因子-23 (fibroblast growth factor-23,FGF-23)^[7] 的缺乏或者过表达都有可能干扰牙齿细胞外基质的分泌和矿化,最终导致牙齿发育异常。

本研究结果显示,CT 扫描后重建结果表明与 WT 小鼠比较,PTHrP KI 小鼠下颌第一磨牙的长度缩短;通过对下颌第一磨牙进行 HE 染色、分析,结果

发现 PTHrP KI 小鼠下颌第一磨牙的长度明显缩短;进一步分析表明,PTHrP KI 小鼠下颌第一磨牙前期牙本质的比例明显高于 WT 小鼠。在牙本质的发育阶段,成牙本质细胞分泌细胞外基质形成前期牙本质,前期牙本质在不断矿化之后形成牙本质,如果前期牙本质的矿化过程受阻,则前期牙本质占总牙本质的比例就会明显升高^[6]。本研究 HE 染色结果表明,小鼠 PTHrP 核定位序列和 C 末端缺失可能导致了牙本质基质生成减少和矿化的异常。

应用免疫组织化学法进行分析,结果发现,PTHrP KI 小鼠的 Collagen- I 在磨牙区的阳性表达比例明显小于 WT 小鼠。Collagen- I 是成牙本质细胞分泌的细胞外基质的主要成分,并且在牙本质矿化过程中能够作为羟基磷灰石沉积的框架^[8]。研究结果表明,小鼠 PTHrP 核定位序列和 C-末端缺失导致了小鼠磨牙细胞外基质形成减少。PTHrP KI 小鼠下颌第一磨牙牙本质中 DSP 的阳性面积明显小于 WT 小鼠,DSP 是由牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein,DSPP)基因转录后进行编辑合成,不仅能够促进成牙本质细胞的分化,而且还能够在牙本质的矿化过程中调节羟基磷灰石晶体的形成,而且能够促进前期牙本质形成牙本质,因此,DSP 也被认为是牙本质矿化的重要指标^[9]。本研究结果表明,PTHrP 核定位序列和 C 末端缺失导致了 DSP 合成减少,进而阻止了前期牙本质的矿化过程。免疫组织化学结果发现,PTHrP KI 小鼠下颌第一磨牙髓和上皮根鞘处 p27 的阳性细胞比例明显增加,而 Ki-67 的阳性细胞比例则有所降低。在有丝分裂期,Ki-67 表达水平最高,因此可以把 Ki-67 作为细胞增殖状态重要细胞因子^[10-11]。p27 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin dependent kinase inhibitors,CDKI)家族成员,CDKI 能够和细胞周期蛋白-细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)复合物结合,抑制 CDK 的活性,从而阻断细胞的增殖过程^[12]。而 p27 是 PTHrP 的下游靶标,当 PTHrP KI 小鼠体内表达 PTHrP 蛋白中核定位序列和 C-末端缺失,导致残缺的 PTHrP 蛋白不能进入细胞核,丧失了对 p27 的调控抑制作用,从而导致了 p27 表达水平上调^[13]。

PTHrP 发挥促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用是通过其蛋白的 NLS 和 C-末端以细胞内分泌的方

式进入细胞核后实现的,而 PTHrP KI 小鼠体内的 PTHrP 蛋白缺失了核定位序列和 C-末端。体外研究表明,PTHrP 缺失核定位序列和 C-末端片段能调控细胞周期相关细胞因子的表达,从而使得细胞凋亡明显增加^[14]。研究发现,PTHrP 在牙齿间充质细胞、牙乳头、上皮根鞘等处均有表达^[15],而 PTHrP KI 小鼠分泌的 PTHrP 蛋白因为缺失核定位序列和 C-末端,失去了通过细胞内分泌方式进入细胞核来发挥促细胞增殖的作用,导致牙髓 p27 蛋白表达水平上调,Ki-67 蛋白表达水平下降,导致牙髓间充质细胞的凋亡增加和向成牙本质细胞的分化减少,进而导致成牙本质细胞胞外基质分泌减少,并且进一步影响了牙本质的生成和矿化;此外,牙根的形成和上皮根鞘密切相关^[16-17],同样,PTHrP 蛋白核定位序列和 C-末端缺失还可能导致了小鼠磨牙上皮根鞘处的细胞凋亡增加,进而导致了 PTHrP KI 小鼠磨牙牙根发育障碍。

综上所述,PTHrP 核定位序列和 C-末端缺失导致小鼠磨牙细胞增殖受阻,牙本质细胞外基质分泌减少,矿化障碍,最终导致了小鼠磨牙的发育异常。

参考文献

[1] LEE S, MANNSTADT M, GUO J, et al. A homozygous [Cys25]PTH(1-84) mutation that impairs pth/pthrp receptor activation defines a novel form of hypoparathyroidism[J]. J Bone Miner Res, 2015, 30(10):1803-1813.

[2] HIRAI T, KOBAYASHI T, NISHIMORI S, et al. Bone is a major target of PTH/PTHrP receptor signaling in regulation of fetal blood calcium homeostasis[J]. Endocrinology, 2015, 156(8):2774-2780.

[3] MIAO D, LI J, XUE Y, et al. Parathyroid hormone-related peptide is required for increased trabecular bone volume in parathyroid hormone-null mice[J]. Endocrinology, 2004, 145(8):3554-3562.

[4] MIAO D, SU H, HE B, et al. Severe growth retardation and early lethality in mice lacking the nuclear localization sequence and C-terminus of PTH-related protein[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(51):20309-20314.

[5] 金曙蕾. 甲状旁腺素相关肽核定位序列和 C 末端缺失导致小鼠皮肤衰老的机制研究[D]. 南京:南京医科大学, 2009.

[6] 刘洪, 杨留才, 苗登顺. 1, 25 二羟维生素 D3 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.

[7] 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.

[8] LIU H, GUO J, WANG L, et al. Distinctive anabolic roles of 1, 25-dihydroxyvitamin D(3) and parathyroid hormone in teeth and mandible versus long bones[J]. J Endocrinol, 2009, 203(2):203-213.

[9] 张菁, 梅陵宣. 牙本质涎蛋白在牙齿发育、牙本质疾病中的表达和作用[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(5):294-297.

[10] COSARCĂ A S, MOCAN S L, PĂCURAR M, et al. The evaluation of Ki67, p53, MCM3 and PCNA immunoexpressions at the level of the dental follicle of impacted teeth, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors[J]. Rom J Morphol Embryol, 2016, 57(2):407-412.

[11] 郭钰英, 蒙国照, 钱成明. 核仁素和 Ki-67 在口腔鳞癌与癌前病变中的表达及意义[J]. 口腔医学研究, 2011, 27(11):974-977.

[12] GUO J, MA Q, ZHOU X, et al. Inactivation of p27kip1 promotes chemical hepatocarcinogenesis through enhancing inflammatory cytokine secretion and STAT3 signaling activation[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(10):1967-1976.

[13] 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.

[14] FIASCHI-TAESCH N, SICARI B, UBRIANI K, et al. Mutant parathyroid hormone-related protein, devoid of the nuclear localization signal, markedly inhibits arterial smooth muscle cell cycle and neointima formation by coordinate up-regulation of p15Ink4b and p27kip1[J]. Endocrinology, 2009, 150(3):1429-1439.

[15] KATO A, SUZUKI M, KARASAWA Y, et al. PTHrP and PTH/PTHrP receptor 1 expression in odontogenic cells of normal and HHM model rat incisors[J]. Toxicol Pathol, 2005, 33(4):456-464.

[16] 段学静, 杨丕山, 李纾. 上皮根鞘在牙根发育中的作用[J]. 国际口腔医学杂志, 2005, 32(4):266-268.

[17] 刘晓辉, 苑芳, 邱宜农, 等. 上皮根鞘结构对牙根发育的影响[J]. 上海口腔医学, 2014, 23(2):184-187.

(收稿日期:2018-05-22 修回日期:2018-06-26)

(上接第 3747 页)

[25] ARONIN C E, SHIN S J, NADEN K B, et al. The enhancement of bone allograft incorporation by the local delivery of the sphingosine 1-phosphate receptor targeted drug FTY720[J]. Biomaterials, 2010, 31(25):6417-6424.

[26] ARONIN C E, SEFCIK L S, THOLPADY S S, et al. FTY720 promotes local microvascular network formation

and regeneration of cranial bone defects[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(6):1801-1809.

[27] CLAES L, RECKNAGEL S, IGNATIUS A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions[J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(3):133-143.

(收稿日期:2018-04-28 修回日期:2018-06-10)