

[文章编号] 1000-1182(2006)01-0011-04

表皮生长因子受体在人牙周膜成纤维细胞体外矿化中的作用

李 纾¹, 杨丕山¹, 曹金芳², 葛少华¹, 潘克清¹

(1.山东大学口腔医院 牙周科, 山东 济南 250012; 2.温州医学院附属口腔医院 口腔内科, 浙江 温州 325027)

[摘要] 目的 探讨表皮生长因子受体(EGFR)在人牙周膜成纤维细胞(hPDLC)体外矿化中的作用。方法 体外培养hPDLC, 运用免疫细胞化学技术, 对hPDLC体外矿化前后EGFR的表达进行比较研究; 应用原位杂交及RT-PCR技术, 对矿化前后的hPDLC mRNA进行检测。结果 诱导前EGFR呈高表达, 随着地塞米松诱导时间的延长, 其表达逐渐下降, 在矿化结节形成后的第4周, 几乎呈阴性表达, 与成骨细胞中EGFR的表达一致。原位杂交中杂交信号与免疫细胞化学的检测结果基本一致, RT-PCR的mRNA半定量检测发现, 随着hPDLC的体外矿化, 碱性磷酸酶升高, EGFR表达降低。结论 EGFR在hPDLC的矿化过程中起着负调控作用, 与牙周膜自身结构的稳定性有关。

[关键词] 表皮生长因子受体; 牙周膜成纤维细胞; 矿化; 细胞培养

[中图分类号] R780.2 [文献标识码] A

Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Human Periodontal Ligament Cells during Their Mineralization in vitro LI Shu¹, YANG Pi-shan¹, CAO Jin-fang², GE Shao-hua¹, PAN Ke-qing¹. (1. Dept. of Periodontology, School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Periodontology, Faculty & Hospital of Stomatology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

[Abstract] Objective To investigate the expression of epidermal growth factor receptor(EGFR) during the mineralization of human periodontal ligament cells(hPDLC) in vitro. Methods Studies using specific antibodies to immunolocalize EGFR in the mineral differentiating hPDLC were undertaken to investigate the different expression during the inducing process. In situ hybridization and RT-PCR technique were used to investigate the transcripts encoding the protein of EGFR. Results The results showed that immunocytochemical labeling gradually decreased following the elong of the induce time, downing to nearly negative at the 4th week and the signal of EGFR transcripts was weaker in the induced hPDLC than that in uninduced. Conclusion EGFR has a negative regulation function during the mineralization of hPDLC.

[Key words] epidermal growth factor receptor; periodontal ligament cells; mineralization; cell culture

研究表明^[1-4]表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及其受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)不仅在口腔涎腺肿瘤等多种肿瘤中有重要的作用,而且在腭部的发育、牙周组织的发育及牙齿萌出过程中也有重要的作用。本实验采用免疫细胞化学、原位杂交和RT-PCR技术,对EGFR在人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament cells, hPDLC)体外矿化过程中的表达进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

地塞米松(Sigma公司,美国),抗坏血酸(上海伯奥生物科技公司), β -磷酸甘油钠(E. Merck, Darmstadt公司,德国),碱性磷酸酶试剂盒(北京中生生物工程高技术公司),EGFR一抗、免疫组化SABC试剂盒、EGFR探针和原位杂交试剂盒(武汉博士德试剂公司),总RNA一步法提取试剂盒(Gibco公司,美国),DEPC(Sigma公司,美国),一步法RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司,美国),DNA Marker DL2000(大连宝生物公司),Gene Amp PCR system 2400(Perkin-Elmer公司,美国)。

[收稿日期] 2005-03-13; [修回日期] 2005-09-14

[基金项目] 山东省中青年科学家奖励基金资助项目(02BS096)

[作者简介] 李 纾(1964-),男,山东人,副教授,博士

[通讯作者] 杨丕山, Tel: 0531-8382368

1.2 细胞培养

应用含10%胎牛血清的DMEM培养基,常规条件下行hPDLC原代及传代培养,取4—8代的细胞用于实验。平行条件共培养6例。取兔长骨骨膜作成骨细胞的培养,用于实验对照。

1.3 矿化诱导

将第4代hPDLC用0.25%的胰蛋白酶消化,分别接种于4个含有10 mm×20 mm大小盖片的25 mL培养瓶中,其中加入 10^{-5} mmol/L的地塞米松、10 mmol/L-磷酸甘油钠和0.5 μ g/L的维生素C,每3天换液1次,共培养4周。

1.4 免疫细胞化学染色

取诱导培养1, 2, 3, 4周的hPDLC和正常的成骨细胞,胰酶消化后,接种到含有盖片的24孔培养板中,待细胞贴壁伸展完全后,取出盖片,95%酒精固定15 min。采用免疫细胞化学SABC法,在新鲜配制的0.5% H_2O_2 的甲醇溶液中处理10 min,以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水冲洗3次,血清封闭20 min,EGFR一抗37 $^{\circ}C$ 孵育2 h, PBS漂洗,生物素化二抗37 $^{\circ}C$ 作用20 min, PBS漂洗,滴加试剂SABC 37 $^{\circ}C$ 作用20 min, DAB显色剂显色,苏木素复染,常规封片。用抗体稀释分别代替一抗和二抗作为阴性对照,以成骨细胞为实验对照。参照对照片,免疫细胞化学染色后,镜下细胞被染成着色部位特异的颗粒状棕黄色者为阳性细胞,无色或着色呈单一的浅黄色者为阴性。

1.5 原位杂交

取诱导培养1, 2, 3, 4周的hPDLC和正常的成骨细胞,胰酶消化后,接种到含有盖片的24孔培养板中,待细胞贴壁伸展完全后,取出盖片,4%多聚甲醛室温固定1 h,蒸馏水冲洗。参照试剂盒说明进行操作,用3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶暴露mRNA, 37 $^{\circ}C$ 预杂交2 h, 37 $^{\circ}C$ 杂交过夜,常规洗片,显色,封片。以PBS代替EGFR探针作为阴性对照。

1.6 碱性磷酸酶活性测定

取对数生长期的hPDLC,胰酶消化后计数细胞数量,离心后加蒸馏水,Uibra超声碎细胞仪上破细胞,离心,取上清液10 μ L加到1 mL的试剂工作液中。试剂工作液为16 mmol/L对硝基苯磷酸盐、350 mmol/L 2-氨基-2-甲基-1-丙醇缓冲液(pH=10.9)和2.0 mmol/L $MgCl_2$ 的混合液。37 $^{\circ}C$ 孵育10 min, RA-50型生化分析仪37 $^{\circ}C$ 、 A_{405} 条件下,测定碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的含量,每一样本分别测定3次,取其平均值计为一个样本的数值。

1.7 RT-PCR反应

1.7.1 hPDLC总RNA的提取与纯度测定 采用Trizol

RNA提取试剂盒一步法提取hPDLC细胞总RNA。取4 μ L RNA样品加蒸馏水到1 mL,用1 mL蒸馏水作空白对照,分光光度计上测定260 nm、280 nm及230 nm处的OD值,计算 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的比值,来表示RNA的纯度。取10 μ L RNA样品(约2 μ g RNA)进行甲醛琼脂糖凝胶电泳,检测28 s/18 s带的情况,来检测RNA的完整性。

1.7.2 实验引物和反应过程 EGFR引物序列为¹⁹5'-ACCTGCGTGAAGAAGTGTTC-3', 5'-CACATCTCCATCACTTATCTCC-3', 内参照甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物序列为¹⁹5'-GTCTTACCACCATGGA-GAAGGCT-3', 5'-CATGCCAGTGAGCTTCCC CGT-TCA-3'。RT-PCR反应为50 $^{\circ}C$ 逆转录cRNA链30 min, 94 $^{\circ}C$ 预变性2 min,以灭活RTase活性,然后进入PCR程序,30次循环后72 $^{\circ}C$ 延伸8 min,降温至4 $^{\circ}C$ 。

1.7.3 PCR产物分析 取10 μ L PCR产物,行1.5%琼脂糖凝胶电泳以鉴定反应产物,紫外灯下照相。由于ADPDH为体内恒定表达基因,故以其为EGFR基因表达程度的参与标准,分别对hPDLC诱导后各期的PCR做积分光密度分析(平均光密度值×面积),半定量确定EGFR mRNA表达。

1.8 统计处理

采用SAS 6.12软件包,应用单因素方差分析(ANOVA)对诱导前及诱导后各时间段之间ALP的检测结果进行统计分析。

2 结果

2.1 免疫组化检测结果

诱导培养前,正常hPDLC中EGFR呈高表达(图1),诱导培养1周时,EGFR的表达开始降低,第2,3周时EGFR表达呈弱阳性,至第4周时呈阴性表达(图2),成骨细胞中EGFR呈阴性表达。



图1 诱导培养前hPDLC中EGFR高表达 SABC ×40

Fig 1 Positive expression of EGFR in hPDLC before inducement SABC ×40



图2 诱导培养4周时hPDLC中EGFR表达阴性 SABC ×40
Fig 2 Negative expression of EGFR in hPDLC after 4 weeks
inducement SABC ×40

2.2 原位杂交

诱导前hPDLC原位杂交检测EGFR mRNA为阳性(图3),随诱导培养时间的延长,EGFR mRNA的杂交信号逐渐减弱,至第4周时为阴性表达(图4)。



图3 诱导培养前hPDLC中EGFR mRNA阳性表达 原位杂交 ×20

Fig 3 Positive expression of EGFR mRNA in hPDLC before
inducement in situ hybridization ×20

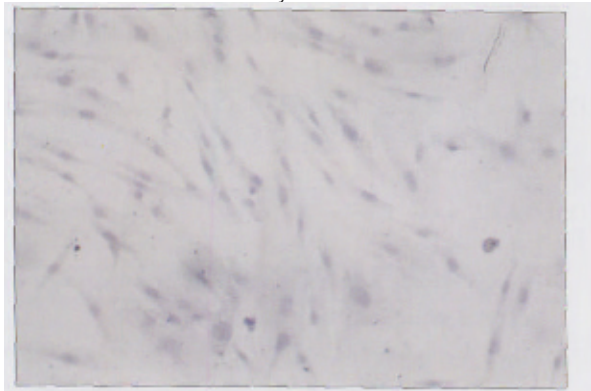


图4 诱导培养4周时hPDLC中EGFR mRNA阴性表达 原位杂交 ×20

Fig 4 Negative expression of EGFR mRNA in hPDLC after 4
weeks inducement in situ hybridization ×20

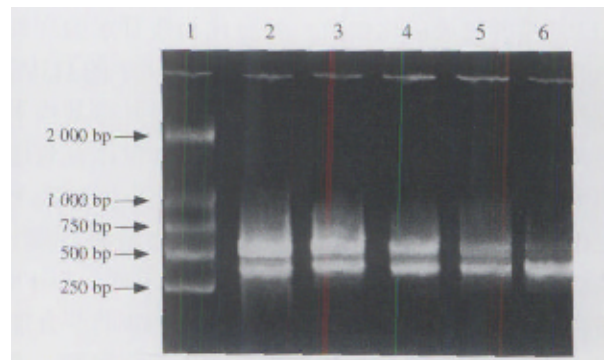
2.3 碱性磷酸酶活性测定结果

诱导前hPDLC的ALP活性即OD值为 40.20 ± 8.90 ,诱导1, 2, 3和4周时ALP活性分别为 68.00 ± 9.65 、

132.00 ± 6.28 、 152.20 ± 3.86 和 152.60 ± 1.21 。经单因素方差分析表明,诱导后4个时间段的ALP活性与诱导前比较均存在统计学差异($P < 0.01$)。诱导后2, 3和4周时同诱导后1周时比较也存在统计学差异($P < 0.05$)。

2.4 RT-PCR反应结果

采用一步法提取hPDLC中EGFR mRNA,其 A_{260}/A_{280} 值为1.863, A_{260}/A_{230} 值为1.751,均在正常范围内,表明所提RNA基本无蛋白质污染,无残存的盐分。甲醛琼脂糖凝胶电泳的结果表明RNA无明显降解。PCR产物琼脂糖电泳结果有两条带,分别位于Marker的500 bp及500 bp与250 bp之间,与预期结果EGFR 516 bp及GAPDH 393 bp结果一致。各组电泳带按hPDLC诱导前和诱导时间的延长,亮度逐渐减弱(图5)。



1: Marker; 2: 诱导前hPDLC中的EGFR; 3: 诱导1周后hPDLC中的EGFR; 4: 诱导2周后hPDLC中的EGFR; 5: 诱导3周后hPDLC中的EGFR; 6: 诱导4周后hPDLC中的EGFR

图5 EGFR RT-PCR结果电泳图

Fig 5 Diagram of EGFR in induced hPDLC by RT-PCR

3 讨论

本研究结果表明EGFR与hPDLC的矿化呈负相关。Aronow等^[7]研究表明EGF可以抑制体外培养的大鼠胚胎颅骨细胞的自发性分化,并且对地塞米松诱导的大鼠骨髓干细胞和牙周膜成纤维细胞的分化也具有明显的抑制作用,这些细胞的成骨方向分化都与EGFR的合成降低有关,本研究也证实了这一推断。这些结果提示hPDLC可以根据牙周局部环境的需要,通过自身EGFR的生物合成量的变化,调控hPDLC向成骨细胞方向分化,EGF和EGFR可能调控牙周组织的成骨速度及成骨进程而在牙周组织骨化、再生和改建等过程中具有重要作用。

EGFR能够抑制牙周组织的矿化,维持牙周组织结构稳定性的可能调节机制为:甲状旁腺激素可以调节EGFR的表达^[8]。有证据表明在乳腺和肝脏中甲状旁腺激素可以影响EGFR的表达^[9],并且这种调

节作用具有组织特异性。体外培养研究^[10]表明,EGF可以通过前列腺素调节机制刺激骨吸收,并且可以影响成骨细胞的分化,因而EGF和EGFR被认为与骨改建有密切关系。

为了进一步说明地塞米松诱导的PDLC中EGFR的降低是由于EGFR mRNA的降低所致,本实验通过原位杂交和RT-PCR技术对EGFR mRNA的含量进行测定,原位杂交结果显示,随着EGFR表达的降低,EGFR mRNA的表达也降低。Matsuda等^[11]用Northern blot方法检测的结果为地塞米松可以使EGFR的合成降低50%,而EGF则可使EGFR的合成增加2倍。

本研究表明EGFR可以作为判定PDLC含有未分化细胞的标准之一,PDLC虽然具有强的胶原合成活性,并且具有完全分化的成纤维细胞的形态特性,但体外经适当条件下的诱导,PDLC可以表达高的ALP活性并形成矿化结节,并分化为成骨细胞样细胞^[12]。体内牙周组织再生过程中,PDLC中的ALP活性升高,从EGFR的表达角度看PDLC仍具有某些未分化细胞的特性。体外地塞米松和EGF可以有效地调节PDLC的ALP活性及EGFR的表达,应用地塞米松作用于体外培养的PDLC,可以进一步增加其碱性磷酸酶的活性。并且体外形成矿化结节时,EGFR蛋白的合成和表达的降低,从而降低EGF的结合能力。体内放射自显影技术分析,前成骨细胞和前成软骨细胞表达大量的EGFR,随着它们的分化其表达急剧降低,分化成熟的成骨细胞和软骨细胞则没有EGFR的表达^[13]。Ros17/2.8细胞是骨肉瘤中高度分化的成骨细胞,体外具有特征性的高ALP活性,但其细胞膜上不表达EGFR^[12]。经EGF或TGF- β 作用的PDLC不仅可以增加EGFR的mRNA的表达,同时降低自主性的和地塞米松诱导的ALP活性,EGF和TGF- β 可以特异性地结合EGFR并刺激EGFR的合成^[14]。EGF和EGFR体系可以负调控周期性张力诱导的PDLC向成骨细胞分化,表明PDLC作为成牙骨质细胞和成骨细胞的细胞源,EGF和EGFR对其具有调控功能^[15]。所有这些都提示上调EGFR的表达可以抑制PDLC成骨方向的分化,EGFR表达的动态变化反映了牙周膜成纤维细胞的分化状态,从而决定了牙周组织的稳定或修复重建的动态变化。

【参考文献】

[1] 俞光岩, 吴启光, 高岩, 等. 表皮生长因子受体在涎腺肿瘤中的表达[J]. 华西口腔医学杂志, 1993, 1(1): 29-31.
(YU Guang-yan, WU Qi-guang, GAO Yan, et al. Expression of epidermal growth factor receptors in salivary gland tumors[J]. West China J Stomatology, 1993, 1(1): 29-31.)

[2] 孙晋虎, 石冰, 王大章. 表皮生长因子对A系小鼠胚胎突细胞增殖代谢的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(3): 161-163.
(SUN Jin-hu, SHI Bing, WANG Da-zhang. Effects of epidermal growth factors on the proliferation and metabolism of A/J mouse embryonic palatal cells[J]. West China J Stomatology, 2002, 20(3): 161-163.)

[3] Cho MI, Garant PR. Expression and role of epidermal growth factor receptors during differentiation of cementoblasts, osteoblasts, and periodontal ligament fibroblasts in the rat[J]. Anat Rec, 1996, 245(2): 342-360.

[4] Lekic PC, McCulloch CA. Periodontal ligament cell populations: The central role of fibroblasts in creating a unique tissue[J]. Anat Rec, 1996, 245(2): 327-341.

[5] Bartlett JM, Langdon SP, Simpson BJ, et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer[J]. Br J Cancer, 1996, 75(3): 301-306.

[6] Kent LW, Rahemtulla F, Michalek SM. Interleukin(IL)-1 and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation of IL-6 production by fibroblasts derived from healthy or periodontally diseased human gingival tissue[J]. J Periodontol, 1999, 70(3): 274-282.

[7] Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, et al. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells[J]. J Cell Physiol, 1990, 145(2): 213-221.

[8] D'Ercolo AJ, Underwood LE. Regulation of fetal growth by hormones and growth factors[M]. In: Falkner F eds. New York: Plenum Press, 1986: 327-338.

[9] Vonderhaar BK, Tang E, Lyster RR, et al. Thyroid hormone regulation of epidermal growth factor receptor levels in mouse mammary glands[J]. Endocrinology, 1986, 119(2): 580-585.

[10] Kumegawa M, Hiramatsu M, Hatakeyama K, et al. Effects of epidermal growth factor on osteoblastic cells in vitro[J]. Calcif Tissue Int, 1983, 35(4-5): 542-548.

[11] Matsuda N, Kumar NM, Ramakrishnan PR, et al. Evidence for upregulation of epidermal growth factor receptors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype in vitro[J]. Arch Oral Biol, 1993, 38(7): 559-569.

[12] Carnes DL, Maeder CL, Graves DT. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingival and periodontal ligament[J]. J Periodontol, 1997, 68(7): 701-707.

[13] Cho MI, Garant PR, Lee YL, et al. Periodontal ligament fibroblasts, preosteoblasts, and prechondrocytes express receptor for epidermal growth factor in vivo: A comparative radioautographic study[J]. J Periodontal Res, 1988, 25(5): 287-294.

[14] Antosz ME, Bellows CG, Aubin JE. Effects of transforming growth factor- β and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells[J]. J Cell Physiol, 1989, 140(2): 386-395.

[15] Matsuda N, Yokoyama K, Takeshita S, et al. Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontal ligament cells in vitro[J]. Arch Oral Biol, 1998, 43(12): 987-997.

(本文编辑 王 晴)