

# 抑制性消减杂交和基因芯片技术在牙髓差异表达基因研究中的应用

吴煜<sup>1,2</sup>综述 周学东<sup>1</sup>审校

(1. 口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学 成都 610041;

2. 广西医科大学附属口腔医院儿童口腔科 南宁 530021)

**[摘要]** 基因表达的时、空、量模式的变化引起了生命过程中细胞的发育和分化、细胞周期的调节、细胞的衰老和死亡以及细胞的病理过程。寻找差异表达基因成为目前基因研究的一个非常重要的内容。近年来, 分离差异表达基因的技术不断完善, 先后出现了消减杂交、mRNA 差异显示法、代表性差异分析法、基因表达系列分析、抑制性消减杂交和(半)定量聚合酶链反应等多种分析技术。本文就牙髓研究中的 2 种常用的大规模快速筛选差异基因的分析方法和应用进展作一综述。

**[关键词]** 牙髓; 抑制性消减杂交技术; 基因芯片技术

**[中图分类号]** Q 78 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.01.021

**Technologies of suppression subtractive hybridization and DNA chip technique and their applications in dental pulp studies** WU Yu<sup>1,2</sup>, ZHOU Xue-dong<sup>1</sup>. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Pediatric Dentistry, Affiliated Stomalological Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** Temporal and spatial distinct patterns of gene expression regulate biological processes involved in cell development, differentiation, cell cycle, death and pathology. The identification of differential expression gene between the different functional status cells has become an important content of gene research. In recent years, a variety of methods have been developed for analyzing differentially expressed genes, including subtractive hybridization, mRNA differential display, representational difference analysis, serial analysis of gene expression, suppression subtractive hybridization, expressed sequence tags, DNA chip, quantitative polymerase chain reaction and semiquantitative polymerase chain reaction. This manuscript reviews the two most commonly used technologies of rapid and large-scale screening for differentially expressed genes, and highlights recent applications in dental pulp studies.

**[Key words]** dental pulp; suppression subtractive hybridization; DNA chip technique

随着人类基因组测序的完成和强有力的基因表达分析技术的发展, 生物医学研究已进入了后基因组时代。基因差异表达分析是功能基因组主要的研究内容之一。研究基因差异表达的方法包括消减杂交、mRNA 差异显示法、代表性差异分析法、基因表达系列分析、抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)、表达序列标签、基因芯片(DNA chip)和(半)定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)等。SSH 和基因芯片技术是近年来发展起来的研究基

因表达谱差异表达的 2 种非常有效的方法, 被广泛应用于牙髓基因差异表达的研究, 包括筛选牙本质分化相关基因、龋病时牙髓特异性表达基因、牙髓增龄性改变差异基因和药物毒性相关基因的检测等, 这些方法将有益于研究者对牙髓生理和病理过程的理解, 促进对牙科疾病的诊断、治疗和预防。本文重点对牙髓研究中的 2 种常用的大规模快速筛选差异基因的分析方法和研究进展作一综述。

## 1 牙髓研究常用的基因差异表达方法

### 1.1 SSH 技术

1996 年, Diatchenko 等<sup>[1]</sup>建立了 SSH 方法, 因

**[收稿日期]** 2010-03-01; **[修回日期]** 2010-07-26

**[作者简介]** 吴煜(1969—), 女, 上海人, 副主任医师, 博士

**[通讯作者]** 周学东, Tel: 028-85501439

其高效和高敏感性已成为现阶段筛选差异表达基因最常用的方法之一。SSH 方法的基本策略是巧妙整合抑制性 PCR 原理设计接头,使引物识别接头序列扩增目片段的同时,非目的片段因接头产生链内互补/锅柄样结构而停止扩增;其次,根据杂交二级动力学原理,即高丰度单链退火时产生同源杂交的速度快于低丰度单链,使原存在丰度差异的基因片段含量趋于一致,促进低丰度的差异表达基因被检出。整个方法仅用 2 轮杂交和 PCR 扩增即可完成,具有假阳性少、重复性强的优点,而在显示低丰度 mRNA 上具有明显的优势;该方法不足之处是需要较多的起始材料,而且不能同时进行数个组织/细胞间或不同处理间的比较。

### 1.2 基因芯片技术

20 世纪 90 年代迅速发展起来的基因芯片技术已被广泛用于基因差异表达分析。基因芯片,又称 DNA 芯片或 DNA 微阵列(DNA microarray),是指将许多特定的寡核苷酸片段或基因片段作为探针,有规律地排列固定于支持物上,然后与待测标记样品的基因按碱基配对原理进行杂交,再通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描,并配以计算机系统对每一探针上的荧光信号作出比较和检测,再用计算机系统进行分析,从而迅速得出所要的信息<sup>[2]</sup>。基因芯片具有高通量、高信息量、快速、并行检测、样品用量少和用途广泛等优点,根据其所用探针的类型分为 cDNA 微阵列芯片和寡核苷酸阵列芯片。

## 2 在牙髓研究中的应用

### 2.1 成牙本质细胞分化相关基因的检测

成牙本质细胞分布在牙髓的边缘,是高度特异性的细胞。为寻找成牙本质细胞分化相关基因,进一步理解其终末分化的机制, Buchaille 等<sup>[3]</sup>用 SSH 技术建立了成牙本质细胞特异性消减 cDNA 文库,将培养的牙髓细胞 cDNA 与成牙本质细胞 cDNA 进行消减,检测其基因表达的模式,确定了 154 个消减 cDNA 克隆的核酸序列。其中, 130 个在成牙本质细胞中表达丰富,已有 10 个基因被确定,如牙本质涎磷蛋白基因(dentin sialoprophosphoprotein, DSPP)、骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)、釉质溶解素(enamelysin)和 I 型胶原  $\alpha_1$  链蛋白基因(collagen  $\alpha_1$ , col  $\alpha_1$ )等; 64 个克隆与已知基因相关, 56 个克隆为未知基因, 82%与

表达序列标签匹配。为进一步确定和克隆新的成牙本质细胞特有的基因, Dey 等<sup>[4]</sup>用 SSH 技术,通过消减共同表达于成牙本质细胞、成骨细胞和牙髓细胞的基因,从而获得了大鼠切牙成牙本质细胞特异性表达的基因。从消减 cDNA 文库 1 290 个克隆中分析出 538 个成牙本质细胞丰富的基因。其中, 498 个克隆(92.6%)与基因序列数据库一致。主要的高同源性基因是 DSPP, 其次是 X 染色体内肽酶同源性调磷基因(phosphate-regulating gene with homology to endopeptidase on the X-chromosome, PHEX), 编码肽链内切酶。Pääkkönen 等<sup>[5]</sup>将临床上从患者口内拔除的第三磨牙天然的牙髓和成牙本质细胞分离后,用基因芯片技术对天然的牙髓组织和成牙本质细胞进行大规模的基因表达谱分析后发现: 1 595 个探针对牙髓阳性, 904 个探针对成牙本质细胞阳性, 16 个表达序列标签编码可能的未知基因仅表达于成牙本质细胞; 微阵列和反转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR), 蛋白质印迹技术(Western blot)证实, Matrilin 4(MATN4)是唯一仅表达于成牙本质细胞, 而牙髓细胞中无表达的细胞外基质。MATN4 和 2 个表达序列标签可以作为成牙本质细胞分化的标志分子。Pääkkönen 等<sup>[6]</sup>用基因芯片比较了天然成牙本质细胞和培养的成牙本质细胞基因表达后发现: 二者有 84% 相似。差异基因仅在 3 类中检出, 包括细胞周期、细胞生长和刺激物检测基因。天然成牙本质细胞刺激物检测基因的表达较培养的成牙本质细胞阳性强, 这可能提示成牙本质细胞是感应细胞。

### 2.2 牙髓增龄性改变差异基因的筛选

牙髓和身体其他组织一样, 也会经历老化, 根尖孔变小, 髓腔变小, 连续沉积牙本质, 牙髓老化继续, 牙髓细胞(成纤维细胞、成牙本质细胞和未分化的间充质细胞等)数量减少, 胶原纤维相应增加, 血管、淋巴管、神经减少的过程。组织的动态平衡有赖于牙髓细胞的活力和调节这些细胞的信号过程。Tranasi 等<sup>[7]</sup>用基因芯片技术比较年轻和老年牙髓生理条件下基因表达的特点, 进一步理解了牙发育和老化的分子机制后发现: 差异基因分属生长因子、转录调节、凋亡调节和细胞外基质基因。免疫系统和淋巴以及血液系统的细胞发育、增殖和分化相关基因在年轻牙髓中高表达, 凋亡路径相关基因在老年牙髓中高表达。Simon 等<sup>[8]</sup>选择牙根未形成、发育早期或已萌出和牙

根完全形成的牛牙成牙本质细胞, 分别提取 RNA 合成 cDNA, 用基因芯片比较成牙本质细胞生命过程中不同阶段的表达特点后发现: 在牙本质发育的 2 个阶段转录调节不同。实验显示: 牙本质基质蛋白-1(dental matrix protein-1, DMP-1)和骨钙蛋白(osteocalcin, OC)在成熟成牙本质细胞中上调, 而 I 型胶原蛋白、DSPP、转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)和 TGF- $\beta$ 1 受体则下调; 在晚期成牙本质细胞中, DSPP 和 I 型胶原蛋白基因表达下调。基因编码的蛋白是牙本质基质的主要成分, 这些基因表达下调表示晚期成牙本质细胞活跃性和沉积率降低。

### 2.3 药物毒性相关基因的检测

Wurtz 等<sup>[9]</sup>用基因芯片技术研究氟作用下成牙本质细胞发生的分子改变后发现: 1 mmol·L<sup>-1</sup> 氟化钠作用于体外培养的成牙本质细胞, 编码细胞外基质蛋白的 asporin 基因、细胞膜相关蛋白成骨细胞特异性因子-2 和肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNF-receptor)的表达下调, 而 Scya-5 的表达则上调。原位杂交和 RT-PCR 证实, 这些 RNA 均出现在发育期的牙形成细胞, 提示当体内氟中毒时, 氟可改变成牙本质细胞的基因表达, 基因的异常表达影响细胞外基质的形成和细胞的交流, 从而导致氟中毒时牙本质的病变。

此外, 最近在大鼠牙髓组织基因芯片的研究中发现: 当大鼠牙齿氟中毒时, 牙髓与正常对照组牙髓相比较, 芯片差异表达 1.5 倍以上的转录本有 247 个, 其中, 219 个在氟中毒牙髓中表达下调, 28 个转录本表达上调。用基因表达微阵列数据分析显示软件(gene microarray pathway profiler, GenMapp)对此差异显著基因的功能进行生物通路分析后发现: 与氟中毒牙本质病变发生过程有关的主要生物通路包括: 1) 骨骼发育通路; 2) 蛋白质修饰、折叠、装配、转运和蛋白质靶向输送通路; 3) 细胞增殖、代谢, 细胞运动性和细胞凋亡通路等<sup>[10]</sup>。

### 2.4 基因芯片比较脱落乳牙和恒牙牙髓的基因表达谱

Nakamura 等<sup>[11]</sup>取脱落乳牙和恒牙牙髓细胞进行体外培养, 先比较 2 种细胞的干细胞特性, 然后提取细胞总的 RNA, 再用 DNA 芯片分析比较牙髓细胞的基因表达谱后发现: 2 种来源的细胞均有间充质干细胞的特点。乳牙牙髓干细胞(stem

cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)有高度的增殖能力和丰富的细胞外基质。SHED 高表达的基因参与细胞增殖和胞外基质, 包括一些细胞因子如成纤维细胞生长因子的相关路径, 由于有高度的增殖能力和广泛的细胞来源以及最少的无痛入侵干细胞收集, SHED 有望作为口腔疾病和其他系统疾病包括神经疾病和心脏病以及改善缺血性疾病再生治疗的细胞来源。

### 2.5 龋病时牙髓差异基因的筛选

牙髓牙本质复合体有再生的特点, 在相对轻度的损伤下, 髓室外壁的成牙本质细胞定位在缺损下, 刺激上调合成和分泌第三期牙本质细胞外基质, 以保护下层细胞、保存组织的活力; 若损伤严重导致局部成牙本质细胞坏死, 被牙髓新生成的成牙本质细胞样细胞置换, 随后在缺损下分泌牙本质细胞外基质, 后一个过程更复杂, 包括祖细胞的征募和诱导分化产生牙本质基质<sup>[12]</sup>。临床上, 牙髓分子改变的分类和描述有助于剖析疾病过程的分子路径, 辨别和确定治疗干预的潜在靶目标, 确定潜在的有利于诊断的生物标志。

Sulkala 等<sup>[13]</sup>用芯片技术比较健康和龋病牙髓组织基因表达特点后发现: 基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)高度表达于正常和在局限性龋可逆牙髓炎的牙髓组织中, 而在釉质和牙本质龋病时牙髓的表达较正常牙髓低。这就说明: 龋病可能下调牙髓组织中 MMP-13 的表达。MMP-13 在健康牙髓中高表达, 说明其在牙髓细胞外基质转化中起着重要的作用。Pääkkönen 等<sup>[14]</sup>用 cDNA 微阵列技术研究健康和龋病时牙髓组织的差异基因, 结果发现了一些龋病和健康牙髓表达差异的基因; 另外, 还检测到一些未知的在牙髓组织中高表达的基因。这些改变的或高表达的基因分为以下几类: 1) 基因表达(DNA 修复和复制); 2) 凋亡; 3) 细胞分化; 4) 细胞生长; 5) 炎症细胞调节; 6) 神经或血管。3 个神经系统功能相关的基因在龋病牙髓表达中上调, 说明了神经营养因子在成熟牙髓组织中的重要性。McLachlan 等<sup>[15]</sup>用基因芯片研究临床健康的牙髓和严重龋病的牙髓的基因表达特点后发现: 445 个基因有差异表达, 85 个基因在健康牙髓中表达丰富, 360 个基因在疾病牙髓中表达丰富。

### 2.6 锁骨颅骨发育不全综合征牙髓特异性表达基因的筛选

锁骨颅骨发育不全综合征(cleidocranial dys-

plasia, CCD)是人类常染色体遗传疾病,影响骨和牙齿的形成,症状是囟门不闭合、锁骨发育不良和牙数多<sup>[16]</sup>,与 Runx2 基因突变有关<sup>[17]</sup>。Chen 等<sup>[18]</sup>的研究分析了人类 CCD 乳牙牙髓细胞和正常儿童脱落乳牙牙髓的基本细胞特点和基因表达特点,用微阵列分析 Runx2 下游参与不同生化路径的可能的 200 多个靶基因、细胞因子和受体。芯片分析显示:芯片所包含的 226 个转录本中,CCD 乳牙牙髓细胞的 25 个基因(11.1%)2 倍上调,17 个基因(7.5%)2 倍下调,其中,20 多个基因编码跨膜蛋白及其受体。转化生长因子 $\beta$ 受体(transforming growth factor beta receptor, TGF- $\beta$ R)和血管内皮细胞生长因子 B(vascular endothelial growth factor B, VEGFB)增加 32.7 和 4.5 倍,骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)降低 2.2 倍,而且细胞因子的表达水平也不同。资料分析证实:一系列的细胞信号和生长基因发生了改变。

### 3 结束语

牙髓基因组学将被高通量技术和信息学的发展改变,随着更多的基因功能被发现,基因的生物学相关发现更为清晰,基因型和表型的联系将得以促进。同时,对基因表达新信息的发现和认识将增加研究者对牙髓生理和病理机制的理解,因而最终改变目前牙科的临床实践,包括诊断、治疗和一般口腔疾病的预后。

### 4 参考文献

- [1] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(12): 6025-6030.
- [2] von Stein OD, Thies WG, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(13): 2598-2602.
- [3] Buchaille R, Couble ML, Magloire H, et al. A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: Identification of novel genes expressed in tooth forming cells[J]. Matrix Biol, 2000, 19(5): 421-430.
- [4] Dey R, Son HH, Cho MI. Isolation and partial sequencing of potentially odontoblast-specific/enriched rat cDNA clones obtained by suppression subtractive hybridization[J]. Arch Oral Biol, 2001, 46(3): 249-260.
- [5] Pääkkönen V, Vuoristo JT, Salo T, et al. Comparative gene expression profile analysis between native human odontoblasts and pulp tissue[J]. Int Endod J, 2008, 41(2): 117-127.
- [6] Pääkkönen V, Bleicher F, Carrouel F, et al. General expression profiles of human native odontoblasts and pulp-derived cultured odontoblast-like cells are similar but reveal differential neuropeptide expression levels[J]. Arch Oral Biol, 2009, 54(1): 55-62.
- [7] Tranasi M, Sberna MT, Zizzari V, et al. Microarray evaluation of age-related changes in human dental pulp[J]. J Endod, 2009, 35(9): 1211-1217.
- [8] Simon S, Smith AJ, Lumley PJ, et al. Molecular characterization of young and mature odontoblasts[J]. Bone, 2009, 45(4): 693-703.
- [9] Wurtz T, Houari S, Mauro N, et al. Fluoride at non-toxic dose affects odontoblast gene expression *in vitro*[J]. Toxicology, 2008, 249(1): 26-34.
- [10] Wu Y, Hao YQ, Li JY, et al. Gene expression profiles of the incisor pulp tissue during fluorosis[J]. Int Endod J, 2010, 43(8): 629-636.
- [11] Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, et al. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp[J]. J Endod, 2009, 35(11): 1536-1542.
- [12] Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair[J]. Caries Res, 2002, 36(4): 223-232.
- [13] Sulkala M, Pääkkönen V, Larmas M, et al. Matrix metalloproteinase-13(MMP-13, collagenase-3) is highly expressed in human tooth pulp[J]. Connect Tissue Res, 2004, 45(4/5): 231-237.
- [14] Pääkkönen V, Ohlmeier S, Bergmann U, et al. Analysis of gene and protein expression in healthy and carious tooth pulp with cDNA microarray and two-dimensional gel electrophoresis[J]. Eur J Oral Sci, 2005, 113(5): 369-379.
- [15] McLachlan JL, Smith AJ, Bujalska IJ, et al. Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1741(3): 271-281.
- [16] Zhou G, Chen Y, Zhou L, et al. CBFA1 mutation analysis and functional correlation with phenotypic variability in cleidocranial dysplasia[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(12): 2311-2316.
- [17] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation[J]. Cell, 1997, 89(5): 747-754.
- [18] Chen S, Santos L, Wu Y, et al. Altered gene expression in human cleidocranial dysplasia dental pulp cells[J]. Arch Oral Biol, 2005, 50(2): 227-236.