

A 结构域阳性纤维连接蛋白促进破骨细胞形成及根尖囊肿骨质破坏

陈雅文¹ 王海丞^{2*} 董伟杰¹

(1. 嘉兴市第一医院口腔科 浙江 嘉兴 314001;

2. 同济大学, 同济大学附属口腔医学院, 上海牙组织修复与再生工程技术研究中心 上海 200072)

[摘要] 目的:检测纤维连接蛋白(fibronectin, FN)可变剪接亚型蛋白在根尖囊肿纤维囊壁中的表达,研究每种亚型在体外诱导形成破骨细胞的能力,探讨FN的可变剪接亚型与根尖囊肿病变的进展和骨破坏的关系。方法:选择8例经病理诊断确诊为根尖囊肿患者手术标本,采用免疫组织化学方法,研究每种FN亚型在病变组织中表达强度,分离成纤维细胞,采用反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法检测总FN及其3种亚型(EDA+FN、EDB+FN、CS1-FN)mRNA的表达水平,并采用条件培养基体外诱导破骨细胞分化。根据每种FN亚型的相对表达情况,研究FN亚型与破骨细胞分化之间的关系。结果:在FN产生的亚型中,含蛋白结构域A的纤维连接蛋白(EDA+FN)在纤维囊壁中染色强度高于EDB+FN和CS1-FN。囊壁成纤维细胞中,EDA+FN的mRNA水平显著高于EDB+FN($P=0.007$)和CS1-FN($P=0.003$),且EDA+FN/总FN值在成纤维细胞的所有亚型中都是最高的(EDB+FN/总FN, $P<0.001$; CS1-FN/总FN, $P<0.001$)。体外诱导破骨细胞形成结果显示,EDA+FN/总FN与破骨细胞生成数量呈正相关($R=0.776$, $P=0.024$)。结论:根尖囊肿囊壁成纤维细胞产生各种FN亚型,EDA+FN为主要类型,且EDA+FN/总FN与成纤维细胞诱导破骨细胞效率呈正相关。提示成纤维细胞产生的EDA+FN有利于导致微环境中破骨细胞形成,促进根尖囊肿的骨破坏。

[关键词] 纤维连接蛋白 蛋白结构域A 破骨细胞 根尖囊肿

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-7651(2018)09-0952-04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.09.008

Extra Domain A Positive Fibronectin Promotes Osteoclast Formation and Bone Destruction of Radicular Cysts. CHEN Ya-wen¹, WANG Hai-Cheng^{2*}, DONG Wei-jie¹. 1. Department of Stomatology, the First Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314001, China; 2. Department of Pathology, School & Hospital of Stomatology, Tongji University, Shanghai Engineering Research Center of Tooth Restoration and Regeneration, Shanghai 200072, China.

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of the isoforms of fibronectin (FN) variable splicing subtype protein in radicular cysts, and to study the ability of each subtype in inducing osteoclasts *in vitro*, and to analyze the association of these isoforms with osteoclastogenesis. **Methods:** Specimens from 8 patients with radicular cysts were selected. Immunohistochemistry was used to study the expression of each isoforms in the fibrous capsule. Fibroblasts were isolated from surgical samples, the mRNA levels of each isoform and total FN were detected by RT-PCR, and the conditioned medium was collected to induce the osteoclasts *in vitro*. The association between FN isoforms and osteoclastogenesis was analyzed. **Results:** In the fibrous capsule of radicular cysts, FN containing the extra domain A (EDA+FN) was stained more intense than EDB+FN and CS1-FN. Consistently, the mRNA level of EDA+FN was also significantly higher than that of EDB+FN ($P=0.007$) and CS1-FN ($P=0.003$) in the fibroblasts. The ratio of EDA+FN/total FN was also the highest among three isoforms (EDB+FN/total FN,

$P<0.001$ and CS1-FN/total FN, $P<0.001$). Only EDA+FN/total FN was positively associated with the Trap+MNC numbers induced by the conditioned medium ($n=8$, $R=0.776$, $P=0.024$). **Conclusion:** The fibroblasts in the fibrous capsule of radicular cysts generate various FN isoforms, in which EDA+FN consisted of the majority and positively associated the oste-

基金项目 国家自然科学基金青年基金项目(编号:81600836)

嘉兴市科技计划项目(编号:2016BY28004)

作者简介 陈雅文(1987~),女,浙江人,硕士,主治医师,主要从事口腔正畸学临床及基础研究。

* **通讯作者** 王海丞, E-mail: haichengwang@sina.com

oclastogenesis induced by fibroblasts. It is suggested that the fibroblasts within the stroma made the microenvironment favourable to the bone destruction of radicular cysts.

[Key words] Fibronectin Extra domain A Alternative splicing Osteoclasts Radicular cyst

根尖囊肿是颌骨常见的牙源性囊肿,占牙源性颌骨囊肿的 52%~68%^[1]。颌骨囊肿的纤维囊壁主要由成纤维细胞、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和细胞因子组成,它们通过调节破骨细胞的分化或活化,创造有利于调节破骨细胞生成的微环境,参与病变的发展^[2]。纤维连接蛋白(fibronectin, FN)是 ECM 的主要成分,通过将 FN 基因中的 EDA、EDB 和 CSI 结构域交替剪接产生不同的亚型:EDA+FN、EDB+FN 或 CSI-FN。有研究表明,成纤维细胞的增殖或牙源性囊肿基质的炎性浸润可能启动了这种可变剪接^[3]。这些 FN 亚型在炎性环境中,通过促进细胞的增殖和运动,可以促进伤口的愈合,调节胚胎的发生,增强肿瘤侵袭性^[4]。以上研究结果提示, FN 的可变剪接可能促进牙源性囊肿的病变进展。我们通过研究 FN 可变剪接体在根尖囊肿中的表达情况及其与体外诱导破骨细胞生成的关系,探讨 FN 可变剪接体在根尖囊肿的进展和骨破坏中的作用。

1 资料与方法

1.1 病例选择和纳入标准 选取 8 例于 2017 年嘉兴市第一医院口腔颌面外科手术切除的颌骨囊肿患者新鲜组织标本,均为根尖囊肿。患者年龄、性别、临床症状和影像学检查结果及随访资料完整。所有患者均签署知情同意书,并由嘉兴市第一医院伦理委员会批准。

1.2 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)检测 根尖囊肿标本经福马林固定,石蜡包埋,厚 4 μm 连续切片,4 $^{\circ}\text{C}$ 用 IST-9、BC-1 和 P11F 抗体(Abcam Ltd., Cambridge, MA, USA)染色过夜。磷酸缓冲液(phosphate buffer, PBS)代替一抗,为阴性对照。然后滴加二抗(1:200),孵育 1 h,用二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB, 中山市金桥生物科技有限公司,中国)染色 3 min,自来水充分冲洗后,苏木精复染 1 min,常规脱水,透明,干燥,中性树脂封片。免疫组织化学染色以胞核、胞质或胞膜上出现黄色或棕色颗粒为阳性,显微镜($\times 400$)下观察。

1.3 细胞培养 从 8 例根尖囊肿囊壁中分离成纤维细胞,并在 α 修饰的 Eagle 培养基(minimal essential medium, α -MEM, Gibco 公司, USA)中培

养。鼠破骨细胞前体细胞系 Raw264.7 为在杜尔伯科改良伊格尔培养基(DMEM, Gibco 公司, USA)中培养。所有细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、95%湿度和 5%CO₂ 下常规培养。

1.4 逆转录-聚合酶链反应 参照 Trizol 试剂盒(Life Technologies 公司, USA)操作说明提取成纤维细胞总 RNA,经紫外分光光度计定量,逆转录为 cDNA。采用 LightCycler 实时 PCR 系统(Roche Diagnostics Ltd, 中国)进行定量 PCR 分析。

1.5 成纤维细胞条件培养基的制备 将 8 例标本的成纤维细胞接种到 100 mm 的培养皿上并生长至 70%~80%融合。然后,用无血清 α -MEM 置换培养基,保持 7 d。收集上清液并以 550 g 离心 10 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存。将 50%上清液、40%新鲜 α -MEM、10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 12 ng/ μL 重组鼠核因子 κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κB ligand, RANKL, R&D 公司, USA)混合,以制备用于在体外诱导破骨细胞的培养培养基。

1.6 诱导破骨细胞生成 将鼠破骨细胞前体细胞系 Raw264.7 细胞以 1000 个细胞/孔的密度接种在 24 孔板中,加入上述条件培养基,培养基每 2 d 更换 1 次,持续 10 d。使用抗酒石酸盐磷酸酶(target retrieval solution, TRAP)试剂盒(Sigma 公司, USA)将细胞染色,显微镜下观察,含有不少于 3 个核(TRAP+MNC)的 TRAP 阳性细胞计为破骨细胞样细胞。

1.7 统计学分析 使用统计软件包 PASW Statistics 18,采用 Student *t* 检验分析配对组间 mRNA 表达水平的差异, Pearson 相关分析和 Spearman 等级相关分析检验 FN 每种亚型 mRNA 的水平及其与总 FN 的比值与破骨细胞生成的相关性。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IHC 检测 FN 蛋白及其亚型在根尖囊肿中的表达 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色结果显示根尖囊肿组织学特征为复层鳞状上皮细胞衬里被纤维囊壁包裹,囊壁中可见充血和胆固醇晶体裂隙(图 1)。免疫组织化学染色

表 1 FN 亚型 EDA+FN、EDB+FN、CS1-FN 与总 FN 的比值及相应破骨细胞生成数量

Table 1 The concentrations of the total FN, the ratio of FN isoforms to total FN, and the corresponding Trap+MNCs $\bar{x} \pm s$

病例数	EDA+FN/Total FN	EDB+FN/Total FN	CS1-FN/Total FN	Trap+MNCs
1	0.40142±0.11784	0.09615±0.02644	0.001450±0.000339	10.25±4.27
2	0.39658±0.01428	0.07951±0.00925	0.000144±0.000039	1.50±1.29
3	0.25990±0.01144	0.05838±0.00646	0.000454±0.000038	6.00±1.83
4	1.05866±0.03206	0.17069±0.10383	0.045590±0.000182	23.00±11.75
5	0.41953±0.06178	0.09179±0.00837	0.002990±0.000408	5.75±0.50
6	0.27813±0.04424	0.07265±0.00455	0.000525±0.000045	8.25±2.22
7	0.47395±0.03410	0.04096±0.00116	0.001020±0.000025	18.00±6.98
8	0.49629±0.01667	0.06614±0.00374	0.001880±0.000144	20.25±5.12

结果显示, FN 的 3 种亚型蛋白 EDA+FN、EDB+FN 和 CS1-FN 在纤维囊壁基质和上皮衬里中均可见, 与总 FN 的分布一致。EDA+FN 染色强度高于 EDB+FN 和 CS1-FN; EDA+FN 的分布也比其他亚型的分布广泛(图 2)。

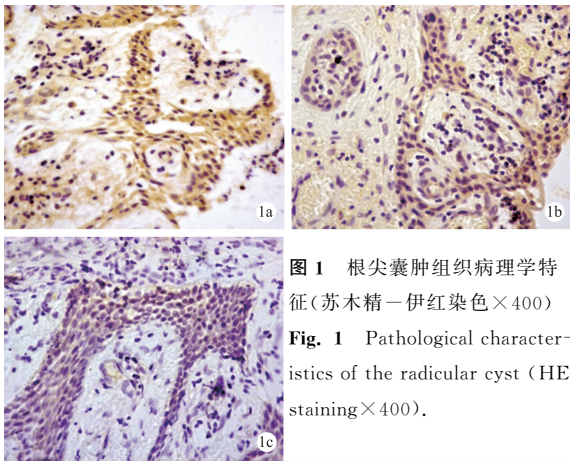


图 1 根尖囊肿组织病理学特征(苏木精-伊红染色×400)
Fig. 1 Pathological characteristics of the radicular cyst (HE staining×400).

2.2 FN 每种亚型 mRNA 的表达水平及其与总 FN 的比值 从不同样本中分离成纤维细胞, 检测总 FN 和不同亚型的 FN mRNA 表达水平。结果表 1 显示, 成纤维细胞中 EDA+FN (1.210±1.358) 的 mRNA 表达水平高于 EDB+FN (0.149±0.155, $P=0.007$) 和 CS1-FN (0.008±0.012, $P=0.003$)。这与 IHC 检测结果一致。同时, EDA+FN/总 FN 的比例, 也是 3 种亚型中的最高(EDB+FN/总 FN: 0.067±0.019, $P<0.001$, CS1-FN/总 FN: 0.007±0.016, $P<0.001$)。

2.3 体外诱导破骨细胞的形成 将分离的成纤维细胞制备的条件培养基, 诱导破骨细胞形成。结果显示(表 1), EDA+FN/总 FN 的比例与 Trap+MNC 数($n=8$, $R=0.776$, $P=0.024$)呈正相关。Spearman 等级相关分析表明两者显著相关($P=0.037$)。而总 FN 的表达及 3 种亚型的 mRNA 水平和 EDB+FN/总 FN 或 CS1-FN/总 FN 的比值与 Trap+MNC 数无关。

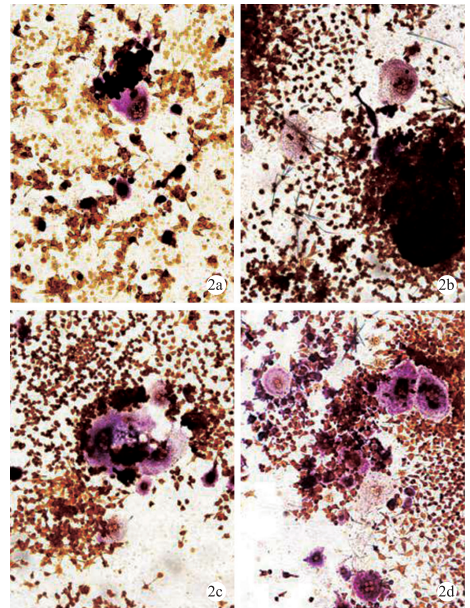


图 2 FN 亚型 EDA+FN, EDB+FN 和 CS1-FN 在根尖囊肿中的表达(免疫组织化学染色, ×400)

Fig. 2 The expression of FN isoforms EDA+FN, EDB+FN, and CS1-FN in the stroma of radicular cysts. (Immunohistochemistry×400)

3 讨论

根尖囊肿是常见的颌骨牙源性炎性病变, 目前认为颌骨内剩余上皮在炎症刺激下增殖形成, 临床表现为受累牙根尖区无痛性肿胀, 伴有牙髓坏死。长期慢性炎症可引发根尖周骨组织破坏, X 线片显示根尖区圆形或卵圆形边界清楚的透射区, 骨质的丧失导致受累牙齿及颌骨的继发损伤^[5]。

FN 是 ECM 的主要成分, 其基因在 III 型重复序列的 3 个区域可发生可变剪接, 分别形成 EDA、EDB 和 III CS 片段。多数正常成人 ECM 中并不表达 EDA+FN, 但是恶性肿瘤及炎症环境中 EDA+FN 的表达普遍上调, 并且 EDA+FN 表达程度常与肿瘤的侵袭能力相关。已有研究结果证实, EDA 片段有促进肿瘤细胞粘附、迁移以及增殖的作用, 并且 EDA+FN 在肿瘤血管及其附近组织中高表

达^[6],但 FN 及其亚型是否参与了根尖囊肿上皮增殖和骨质破坏尚未明确。

本研究采用 IHC 检测方法,比较了 FN 可变剪接亚型:EDA+FN、EDB+FN 和 CS1-FN 在根尖囊肿中表达强度。结果显示,各 FN 亚型均表达于纤维囊壁的基质中,与总 FN 的分布相似^[7]。与 EDA+FN 相比,EDB+FN 或 CS1-FN 表达相对较弱。体外培养囊壁成纤维细胞,检测总 FN 和不同 FN 亚型的 mRNA 表达水平,结果显示成纤维细胞中 EDA+FN 的 mRNA 水平高于 EDB+FN 和 CS1-FN,同时,EDA+FN/总 FN 的比例也是 3 种亚型中的最高。这与根尖囊肿纤维囊壁的 IHC 检测结果一致。提示根尖囊肿慢性炎症是有利于病变发展的肿瘤微环境,可能促进 FN 基因的 EDA、EDB 或 III CS 序列的可变剪接^[8],其中 EDA 外显子是可变剪接发生的主要位点,可能参与了病变进展。

既往研究表明,牙源性角化囊性瘤的纤维囊中的成纤维细胞有利于破骨细胞形成,在颌骨骨破坏的过程中起重要作用^[9]。在本研究中,从根尖囊肿手术标本中分离出成纤维细胞,检测 FN 的 3 种亚型 mRNA 表达水平,并体外培养诱导 Trap+MNC 生成。结果显示,EDB+FN 和 CS1-FN mRNA ($P<0.05$)为低表达,其与 FN 的比值也较低,与 Trap+MNCs 数量无相关性;同时,其在病变组织中染色强度较低,提示 EDB+FN 和 CS1-FN 及其与总 FN 的比值可能与破骨细胞的生成关系不明显。EDA+FN 在病变组织中高表达,但其本身和总 FN 都与破骨细胞生成数量并无相关性;而 EDA+FN/总 FN 的 mRNA 比值则与破骨细胞生成的数量呈正相关,加之以往研究中发现总 FN 能够体外抑制破骨细胞形成^[10],EDA 片段很可能抵消了这种抑制作用,提示 EDA 片段促进破骨细胞发生并参与根尖周骨质破坏过程。

本研究结果表明,根尖囊肿的纤维囊壁中的慢性炎症可能促进了 FN 基因的选择性剪接。纤维囊壁基质的成纤维细胞产生的 FN 亚型 EDA+FN 在囊肿中表达水平明显高于 EDB+FN 和 CS1-FN;

而且体外诱导破骨细胞生成时,其 EDA+FN/总 FN 与破骨细胞的生成数量呈正相关,说明 FN 可能通过基因的选择性剪接,形成了利于破骨细胞发生的微环境,增强了疾病的侵袭性。

参考文献

- [1] Sharifian MJ, Khalili M. Odontogenic cysts: a retrospective study of 1227 cases in an Iranian population from 1987 to 2007 [J]. *J Oral Sci*, 2011, 53(3): 361-367
- [2] Jiang WP, Sima ZH, Li TJ, et al. Identification of the involvement of LOXL4 in generation of keratocystic odontogenic tumors by RNA-Seq analysis [J]. *Int J Oral Sci*, 2014, 6(1): 31-38
- [3] Liu H, Dolkas J, Hoang K, et al. The alternatively spliced fibronectin CS1 isoform regulates IL-17A levels and mechanical allodynia after peripheral nerve injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 158
- [4] Kamarajan P, Garcia-Pardo A, D'Silva NJ, et al. The CS1 segment of fibronectin is involved in human OSCC pathogenesis by mediating OSCC cell spreading, migration, and invasion [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 330
- [5] Garcia CC, Sempere FV, Diago MP, et al. The post-odontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects [J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2007, 12(8): E585-E590
- [6] 王海丞,李翠英.纤维连接蛋白 EDA 片段在肿瘤生长、转移过程中的功能研究进展[J]. *口腔医学研究*, 2007, 23(4): 456-459
- [7] de Oliveira MD, de Miranda JL, de Amorim RF, et al. Tenascin and fibronectin expression in odontogenic cysts [J]. *J Oral Pathol Med*, 2004, 33(6): 354-359
- [8] Elices MJ, Tsai V, Strahl D, et al. Expression and functional significance of alternatively spliced CS1 fibronectin in rheumatoid arthritis microvasculature [J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(1): 405-416
- [9] Bernardi L, Visioli F, Nor C, et al. Radicular cyst: an update of the biological factors related to lining epithelium [J]. *J Endod*, 2015, 41(12): 1951-1961
- [10] Gramoun A, Azizi N, Sodek J, et al. Fibronectin inhibits osteoclastogenesis while enhancing osteoclast activity via nitric oxide and interleukin-1beta-mediated signaling pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(4): 1020-1034

[收稿日期:2018-03-17]

(本文编辑 关隽)