

· 口腔发育生物学研究 ·

Caveolin-1 基因敲除小鼠下颌第一磨牙的表型观察

史璐* 田菲菲 白书锋 冯海玲

(郑州大学第一附属医院, 郑州大学口腔医学院牙体牙髓科 河南 郑州 450000)

[摘要] 目的:观察 Caveolin-1 基因敲除小鼠(knockout, KO)下颌第一磨牙牙胚组织学形态及牙齿表型,为深入研究 Caveolin-1 在牙齿发育中的作用提供组织学基础。方法:经聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)鉴定基因型后,HE 染色观察不同发育阶段的 KO 小鼠及同源野生型(wildtype, WT)小鼠的下颌第一磨牙牙胚组织学形态;显微 CT 观察其牙体硬组织结构。结果:胚胎 14.5 d, WT 鼠牙胚发育进入帽状期,但 KO 鼠牙胚仍处于蕾状期,成釉器未见明显分层及原发性釉结形成。胚胎 16.5 d, KO 鼠成釉器出现细胞分层,但成釉器体积较小,颈环处上皮芽向下方向充质中深入较浅。胚胎 18.5 d, KO 鼠成釉细胞和成牙本质细胞的细胞极化不明显,且成牙本质细胞缺乏典型柱状形态。出生后 1 个月,下颌第一磨牙显微 CT 及三维重建结果显示:KO 鼠与 WT 鼠牙体解剖形态未见明显差异。结论:Caveolin-1 基因表达缺失可导致小鼠下颌第一磨牙牙胚发育蕾状期—帽状期过渡出现暂时性滞后,但对牙齿后期发育无明显影响。

[关键词] Caveolin-1 牙齿发育 Micro-CT 表型观察

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-7651(2018)05-0480-05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.05.006

Phenotypic Observation of Mandibular First Molar in Caveolin-1 Gene Knockout Mice. SHI Lu*, TIAN Fei-fei, BAI Shu-feng, FENG Hai-lin. Department of Endodontics, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, School of Stomatology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the histological morphology of mandibular first molar tooth germ and analyse dental phenotype in caveolin-1 gene knockout (KO) mice. **Methods:** After genotype identification with polymerase chain reaction (PCR), mandibular first molar germs and teeth were collected from caveolin-1 gene knockout mice and wild-type (WT) homologous mice. The histological morphology of tooth germs and dental phenotype were studied by hematein eosin (HE) staining and micro computed tomography (Micro-CT), respectively. **Results:** At E14.5, the tooth germ of WT mouse was at the cap stage; however, the tooth germ of KO mouse was still at the bud stage, and no obvious stratification and primary enamel knot were found. With the tooth germ development, the enamel organ cells of KO mouse stratified into four layers at cap stage (E16.5). While, enamel organ of KO mouse had smaller volume and less invagination of cervical loop into epithelial mesenchymal. At E18.5, the cell polarities of both ameloblasts and odontoblasts were not obvious in KO tooth germ. And the odontoblasts were lack of typical high columnar shapes. The results of Micro-CT and 3D reconstruction showed that no significant difference was found between the two mice's lower first molar anatomic shape. **Conclusion:** The deficiency of caveolin-1 gene led to temporal arrest for the bud-to-cap transition in developmental molar tooth germs without significant influence on the later developmental processes.

[Key words] Caveolin-1 Tooth development Micro-CT Phenotypic observation

胞膜窖(Caveolae)是细胞质膜表面特异性内陷微区,主要由脂类和蛋白质组成。窖蛋白(Cave-

olin)是 Caveolae 的表面标记蛋白,是构成 Caveolae 的完整膜蛋白^[1]。Caveolin 至少有 3 种亚型,其中 Caveolin-1 是 Caveolae 最重要的表面功能蛋白。胞膜窖和窖蛋白在多种细胞生物学功能中起关键作用^[1]。已有的研究表明 Caveolin-1 参与牙胚发育过程^[2~4]。Caveolin-1 基因敲除小鼠被用于多种疾病的研究,与正常小鼠相比显示出一些不同的表

基金项目 国家自然科学基金(编号:U1204813)

河南省高校重点科研项目(编号:18B310030)

作者简介 史璐(1973~),女,山东人,博士,副教授,主要从事牙体牙髓病学的临床和基础研究。

* 通讯作者 史璐, E-mail: lsrq@zzu.edu.cn

型^[5,6],但在牙齿发育方面,其牙齿表型分析尚未见报道。本实验拟以 Caveolin-1 基因敲除小鼠为研究对象,以同源野生型小鼠为对照,对比观察 Caveolin-1 基因敲除对下颌第一磨牙牙胚组织学形态及牙齿解剖的影响,为进一步探讨 Caveolin-1 在牙齿发育方面的作用提供组织学参考。

1 材料与方法

经郑州大学生命科学伦理审查委员会审查,该项目研究内容和过程遵循国际及国家颁布的有关生物医学研究的伦理要求。

1.1 主要试剂和设备 T100 型 PCR 扩增仪、核酸水平电泳仪、化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。纯水系统(美国 Millipore 公司)。全自动组织脱水机、组织包埋机、组织切片机、摊片烤片机、显微镜病理成像系统(德国 Leica 公司)。微型计算机断层扫描(Micro Computed Tomography, Micro CT)μCT35(瑞士 SCANCO Medical AG 公司)。Easy-DNA™ gDNA Purification Kit、DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)(美国赛默飞世尔科技有限公司)。低熔点琼脂糖、50×TAE 缓冲液、GoldView I 型核酸染色剂(10000×)、6×DNA Loading Buffer、1000bp DNA Marker(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 实验动物 Caveolin-1 基因敲除小鼠亲代购自美国 Jackson Laboratory (Maine, USA), 库存号:007083, 遗传背景:C57BL/6, 品系名:B6. Cg-Cav1tm1Mls/J, SPF 级, 基因型:Caveolin-1^{-/-}; 野生型雌性 C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, SPF 级。雄性 Caveolin-1^{-/-}小鼠与野生型雌性 C57BL/6 小鼠交配后得到 Caveolin-1^{+/-}杂合子小鼠。小鼠饲养在 SPF 级实验动物中心, 独立通气笼盒系统中, 环境温度(24.0±0.5)℃。相对湿度 50%~60%, 自由饮食进水, 昼夜光照节律。选用上述 6~8 周龄杂合子性成熟小鼠, 按 1:2 比例合笼, 胎龄计算以小鼠交配见到阴道栓后的中午定为胚胎发育(Embryonic, E)第 0.5 天(E0.5), 新生小鼠出生(Postnatal, PN)当天中午定为第 0 天(PN0)。选取第 E13.5、E14.5、E16.5、E18.5 天胎鼠和 1 月龄小鼠。分离胎鼠头部, 同时剪取小鼠尾尖 1 cm 组织用于基因型鉴定。用于 HE 染色的样本置于 4% PFA, 4℃ 固定 24 h。E18.5 天的样本置于 10% EDTA 室温脱钙 3~4 d。常规石蜡包埋, 5 μm 连续冠状切片, 4℃ 下保存备用。用于 Micro-CT 检测的 1 月龄小鼠下颌骨经

固定后移入 75% 酒精中保存备用。

1.3 基因型鉴定

1.3.1 提取鼠尾基因组 DNA 按 Easy-DNA™ gDNA Purification Kit 产品说明书进行。1.5 mL 离心管中加入 TE 缓冲液 320 μL(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0), 溶液 A(裂解液)20 μL, 溶液 B(沉淀液)10 μL, Protein Degradar (5 g/L)5 μL。将鼠尾剪碎放入上述混合液中, 60℃, 震荡(225 r/min)孵育 12~20 h。然后加入 300 μL 溶液 A 和 120 μL 溶液 B, 震荡混匀; 再加入 750 μL 氯仿, 震荡混匀, 13000 r/min, 4℃ 离心 10 min。将上清液转移至一新的离心管中。加入 1 mL 100% 乙醇(-20℃), 混匀, 冰上孵育 30 min, 13000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃乙醇。加入 500 μL 80% 乙醇(-20℃) 颠倒混匀 3~5 次, 13000 r/min, 4℃ 离心 3~5 min, 弃乙醇。再次离心 1~3 min, 弃乙醇, 晾干 5 min。加入 49 μL TE 缓冲液重悬沉淀物, 加入 1 μL 2 g/L RNase, 37℃ 孵育 30 min。DNA 提取液置 4℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 扩增 引物序列由 Jackson Laboratory 提供, Wild type forward: 5'-GCACACCAAG-GAGATTGACC-3', Common: 5'-CTTGGCT-GTCACCACACAC-3', Mutant reverse: 5'-CTC-CAGACTGCCTTGGGAAAA-3', 由上海生工生物工程技术服务股份有限公司合成, 为干粉状, 稀释 100 倍后等体积混合后备用。PCR 反应体系总体积 20 μL: 2×DreamTaq Green PCR Master Mix 10 μL, 模板 DNA 2 μL, 引物混合物 1 μL, ddH₂O 7 μL。反应条件: 预变性 95℃ 3 min, 变性 95℃ 30 s, 退火 60℃ 30 s, 延伸 72℃ 45 s, 循环 40 次, 72℃ 5 min 终止反应^[7]。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳 取 PCR 扩增产物 6 μL, 在 2% 琼脂糖凝胶中以 150 V 由负极向正极电泳 30 min, 于化学发光凝胶成像系统中拍照观察。

1.3.4 基因型结果判定 common 和 mutant reverse 引物扩增产物长度为 200 bp, 为 KO 小鼠; wildtype forward 和 common 引物扩增产物长度为 661 bp, 为 WT 小鼠; 两条电泳条带均存在的为杂合子小鼠^[7]。

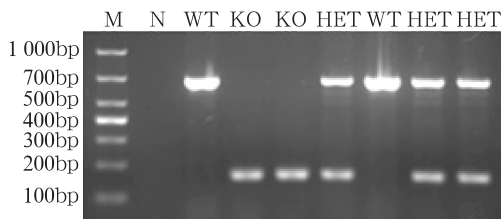
1.4 HE 染色 常规 HE 染色, 中性树胶封片。光学显微镜下观察并拍照。

1.5 Micro CT 分析 Micro CT 采用 μ-CT35 imaging system。扫描时将标本适当固定, 保持牙长轴与扫描平面平行。扫描参数: 360° 旋转, 管电压

70 kV,管电流 114 μ A,X线暴露时间 200 ms,扫描层厚 10.0 μ m。将 Micro-CT 扫描所得二维图片以 DICOM 格式导入 Mimics 14.1 (Materialise software,Belgium)软件进行三维重建。

2 结果

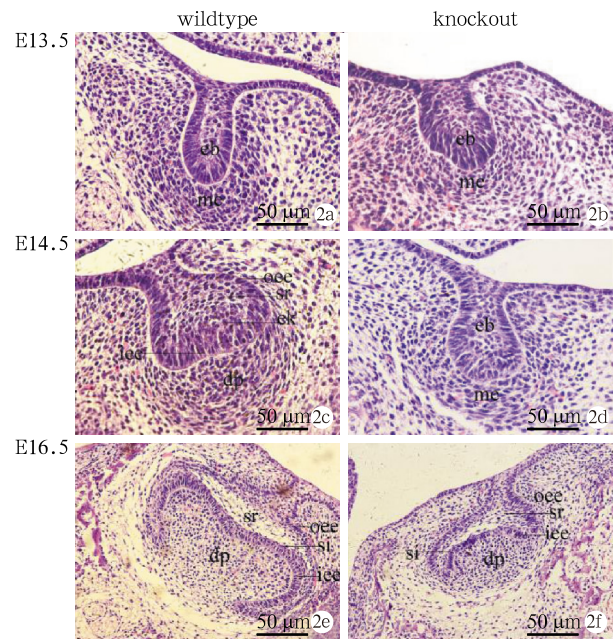
2.1 部分小鼠基因型鉴定结果 结果见图 1。仅 200 bp 位置可见条带为 KO 小鼠,仅 661 bp 位置可见条带为 WT 小鼠,661 bp 和 200 bp 位置均可见条带为杂合子小鼠。



M: Marker (1000 bp DNA ladder); N: 阴性对照 (Negative control); KO: 纯合子 (Homozygote); HET: 杂合子 (Heterozygote); WT: 野生型 (Wild type)

图 1 部分小鼠基因型 PCR 鉴定结果

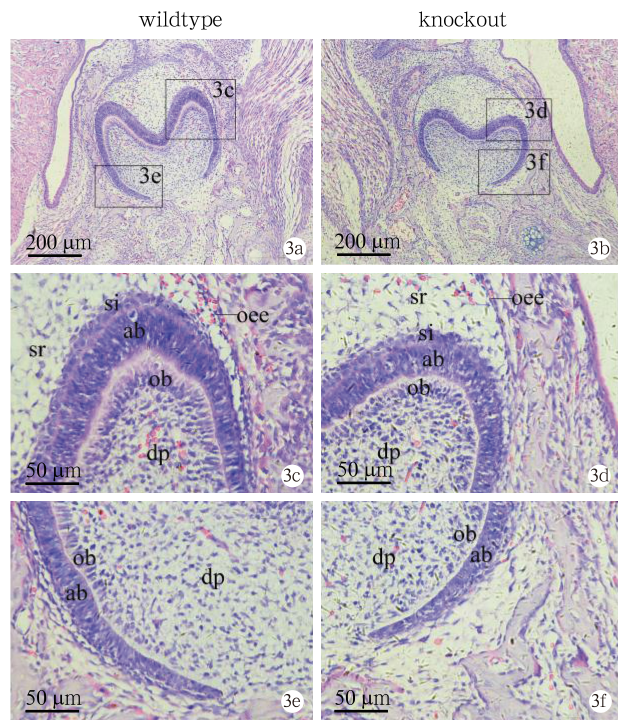
Fig. 1 Results of genotype identification of some mice by PCR.



wildtype: 同源野生型小鼠; knockout: Caveolin-1 基因敲除小鼠; eb: 上皮芽 (epithelium bud); me: 间充质 (mesenchyme); iee: 内釉上皮 (inner enamel epithelium); oee: 外釉上皮 (outer enamel epithelium); sr: 星网状层 (stellate reticulum); si: 中间层 (stratum intermedium); ek: 釉结 (enamel knot); dp: 牙乳头 (dental papilla)

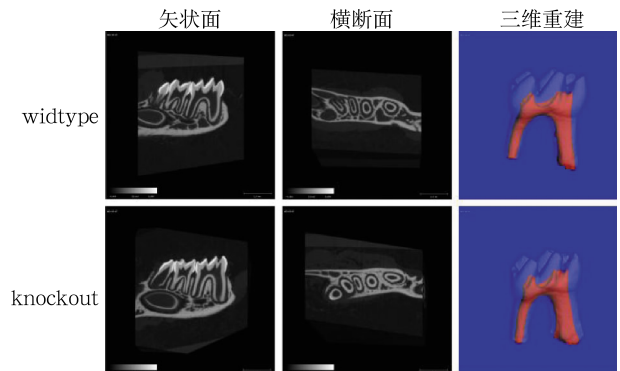
图 2 胚胎 13.5~16.5 d 下颌第一磨牙牙胚苏木精-伊红染色结果
Fig. 2 HE staining results of mandibular first molar tooth germ at 13.5-16.5 embryonic day.

2.2 HE 染色结果 结果见图 2、图 3。E13.5 d, WT 鼠与 KO 鼠均可见上皮局部增生,形成卵圆形上皮芽,其构成细胞类似基底细胞,呈矮柱状,位于



wildtype: 同源野生型小鼠; knockout: Caveolin-1 基因敲除小鼠; oee: 外釉上皮 (outer enamel epithelium); sr: 星网状层 (stellate reticulum); si: 中间层 (stratum intermedium); ab: 成釉细胞 (ameloblasts); ob: 成牙本质细胞 (odontoblast); dp: 牙乳头 (dental papilla)

图 3 胚胎 18.5 d 下颌第一磨牙牙胚苏木精-伊红染色结果
Fig. 3 HE staining results of mandibular first molar tooth germ at 18.5 embryonic day.



wildtype: 同源野生型小鼠; knockout: Caveolin-1 基因敲除小鼠

图 4 Micro CT 扫描及三维重建结果

Fig. 4 Results of Micro-CT scanning and 3D reconstruction.

上皮下方的外胚间叶细胞增生,密集包绕上皮芽。E14.5 d, WT 鼠上皮芽向外胚间叶中生长,体积增大,进入帽状期成釉器,成釉器外釉上皮层、星网状层及内釉上皮层分层明显,内釉上皮局部增厚形成原发性釉结,成釉器下方的外胚间叶细胞凝聚,形成牙乳头;KO 鼠上皮芽仍处于蕾状期,成釉器内未见明显分层及原发性釉结形成。E16.5 d, WT 鼠成釉器凹陷更深,其周缘继续生长,进入钟状期,成釉器

分化为外釉上皮层、星网状层、中间层及内釉上皮层四层细胞,内釉上皮和外釉上皮相连处形成颈环,唇舌侧颈环发育对称;KO 鼠成釉器细胞亦分四层,但成釉器形态扁平,颈环处上皮芽向间充质中突入较浅。E18.5 d,WT 鼠和 KO 鼠牙胚的磨牙形态已经确定。WT 鼠成釉细胞呈高柱状,细胞核远离基底膜,其对应的牙乳头细胞分化为柱状成牙本质细胞,细胞核远离基底膜;KO 鼠成釉细胞亦呈高柱状,但细胞极化不明显;成牙本质细胞缺乏典型的柱状形态,细胞极化不明显。

2.3 Micro-CT 结果 结果见图 4。1 月龄的 WT 鼠和 KO 鼠的下颌第一磨牙均已萌出。二者下颌第一磨牙的牙体解剖形态未见明显差异。

3 讨论

本研究比较了 Caveolin-1 基因敲除小鼠和同源野生型小鼠的下颌第一磨牙牙胚组织学形态和牙齿解剖形态。结果显示:相比于同时期的野生型小鼠,KO 小鼠的牙胚发育在 E14.5~E18.5 d 出现暂时性阻滞,表现为牙胚细胞分层不明显,形态扁平,颈环处上皮芽向下方间充质中突入较浅,成釉细胞和成牙本质细胞极化不明显,成牙本质细胞缺乏典型柱状形态。但萌出后的下颌第一磨牙牙体解剖形态未见明显差异。Miletich 等^[8]在研究磨牙发育过程中 Barx1 的作用时,同样观察到了与本研究相类似的发育暂时性阻滞现象,即 Barx1 表达缺失导致小鼠磨牙牙胚发育自蕾状期向帽状期过渡的过程中出现暂时性停滞,但钟状期以后的牙齿发育未见明显阻滞。进一步的研究提示在牙胚从蕾状期到帽状期的过渡时期,BMP4 直接影响上皮细胞的分化和原发性釉结的形成,促使牙齿发育进入帽状期^[8]。有研究显示在牙上皮中敲除 Shh 后,可引起成牙本质细胞及成釉细胞层排列紊乱,细胞极性不明显,但仍可见釉基质及牙本质基质沉积^[9];这与本实验中所观察到的成釉细胞和成牙本质细胞的形态改变相类似,但导致细胞形态和细胞核极化异常的确切机制尚不明确。新近的研究发现 Caveolin-1 与钙库调控性钙离子通道(Store-operated Calcium Entry, SOCE)的相互作用影响细胞极化的形成^[10]。Caveolin-1 作为信号转导中心,与多种信号通路存在相互作用,其中部分信号通路在牙齿发育中亦发挥着重要作用,例如 BMP、Shh、Wnt 等信号分子。本研究中,Caveolin-1 基因敲除是否影响了上述信号通路的功能,从而引起牙胚发育出现暂时性阻滞仍需进一步研究。

以往的研究表明 Caveolin-1 参与牙胚发育过程:在牙胚发育过程中,Caveolin-1 mRNA 在 E9.5 d 第一鳃弓间充质细胞及 E16.5 d 下颌第一磨牙牙胚细胞中均有表达,且表达水平增加^[3]。Caveolin-1 与细胞外基质金属蛋白酶诱导物(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN/CD147)均表达于牙胚细胞,且随着牙胚的发育表达量逐渐增加^[2],双免疫荧光检测显示二者共定位于成釉细胞^[4]。胞膜窖/Caveolin-1 作为细胞信号转导平台,能够更加高效地、精确地发挥调控作用。当细胞失去这一信号平台后,信号转导将在某种程度上受到影响,对牙胚发育而言,引起牙胚发育的暂时性阻滞。那么,寻找这些与 Caveolin-1 相互作用的信号通路、探索其机制是今后的研究方向之一。但本实验中,Caveolin-1 基因敲除以后,就牙齿整体发育而言并未受到灾难性影响。这一方面说明 Caveolin-1 在牙齿发育中的调控作用可能是有限的,但亦有可能性是:信号转导的调控机制是多方面的,Caveolin-1 是众多调控机制中的一员,当胞膜窖/Caveolin-1 功能缺失时,位于细胞内或细胞膜上的其它调控机制补偿了胞膜窖/Caveolin-1 的功能。以脂筏为例,脂筏是指膜脂双层内含有特殊脂质及蛋白质的微区,胞膜窖/窖蛋白是其中的一员,尚有多种蛋白富集于该区域,如浮舰蛋白(flotillins)等,这些蛋白亦具有广泛的生物学功能^[1]。这种调控机制的多元性使得牙齿发育的分子生物学机制研究更具挑战性。同时提示:对牙胚细胞的细胞膜超微结构及其功能的研究将有助于从微观组织学结构方面揭示信号转导的调控机制。

参考文献

- [1] Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, et al. Role of caveolae and Caveolin-1s in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(4): 1341-1379
- [2] Shi L, Li L, Wang D, et al. Spatiotemporal expression of caveolin-1 and EMMPRIN during mouse tooth development [J]. *J Mol Hist*, 2016, 47(3): 337-344
- [3] 杨林,何永红,沈永岱,等. Caveolin-1 mRNA 在小鼠牙发育过程中的表达[J]. *现代生物医学进展*, 2007, 7(7): 1028-1030
- [4] Schwab W, Harada H, Goetz W, et al. Immunocytochemical and biochemical detection of EMMPRIN in the rat tooth germ: differentiation-dependent co-expression with MMPs and co-localization with Caveolin-1 in membrane rafts of dental epithelial cells [J]. *Histochem Cell Biol*, 2007, 128(3): 195-203
- [5] Volonte D, Zou H, Bartholomew JN, et al. Oxidative

- stress-induced inhibition of Sirt1 by caveolin-1 promotes p53-dependent premature senescence and stimulates the secretion of interleukin 6 (IL-6) [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(7): 4202-4214
- [6] Lim JS, Nguyen KC, Han JM, et al. Direct regulation of TLR5 expression by caveolin-1 [J]. *Mol Cells*, 2015, 38(12): 1111-1117
- [7] 周胜强, 罗东, 黄素芬, 等. Caveolin-1 基因敲除小鼠子代基因型的鉴定及繁育方法 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(3): 228-232
- [8] Miletich I, Yu WY, Zhang R, et al. Developmental stalling and organ-autonomous regulation of morphogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(48): 19270-19275
- [9] Dassule HR, Lewis P, Bei M, et al. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth [J]. *Development*, 2000, 127(22): 4775-4785
- [10] Huang YW, Chang SJ, Harn HI, et al. Mechanosensitive store-operated calcium entry regulates the formation of cell polarity [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(9): 2086-2097
- [收稿日期: 2017-12-05] (本文编辑 李四群)

2018 年 IADR 中国分会年会在武汉举行

经中华口腔医学会批准,由 IADR 中国分会主办,武汉大学口腔医院承办的 IADR 中国分会年会,于 2018 年 3 月 28~30 日在武汉召开,本次大会共有近 300 名代表注册参会。

3 月 29 日上午八点会议准时开幕,中华口腔医学会会长俞光岩教授首先致辞,欢迎来自国际和国内的口腔医学专家学者共聚一堂进行学术交流,随后,IADR 中国分会主席郭传斌教授和执行主席边专教授分别致辞,对学会一如既往的鼎力支持和全国各兄弟单位的共同努力表示感谢,最后 IADR 副主席 Paula Moynihan 教授发言,预祝大会成功举办。

本次年会特邀 IADR 副主席、英国纽卡斯尔大学 Paula Moynihan 教授、JDR-Clinical & Translational Research (JDR-CTR) 主编、加拿大麦吉尔大学 Jocelyne Feine 教授、中国工程院外籍院士、美国国家医学院院士、美国加州大学洛杉矶分校王存玉教授和 IADR 亚太区候任执行理事、香港大学牙学院金力坚教授四位外宾以及多位国内著名专家进行特邀演讲。另外,分别有 30 位参会代表进行大会发言,152 位会议代表进行壁报展示。

年会期间,还召开了 IADR 中国分会理事会议,选举产生了新一届理事会,陈吉华教授任 IADR 中国分会主席(2018-2020)。同期举行的第 14 届 IADR 中国分会杰出青年学者奖比赛,来自四川大学的樊怡博士和上海交通大学文晋博士获得一等奖,空军军医大学柯瑶、蒋文凯、武汉大学林楚娇、北京大学刘洋分别荣获二等奖,其余十名选手获得优秀奖。闭幕式上,进行了杰出青年学者奖颁奖仪式,郭传斌主席和边专执行主席再次对各位嘉宾表示衷心感谢,新任主席陈吉华教授发表就职讲话,郭传斌主席将主席胸牌传给陈吉华主席,会议胜利闭幕!

IADR 中国分会年会为口腔科研工作者,特别是青年学者搭建起交流的平台,旨在促进我国口腔医学研究水平的持续发展,进一步增强 IADR 中国分会的凝聚力和影响力,并加强各院校间口腔医学研究领域的交流与合作以及国际间交流。