

转谷氨酰胺酶 2 在口腔疾病发病中的作用研究

黄海燕¹ 宋爱梅^{2,3*} 孙钦峰^{2,3*}

(1. 中国科学技术大学附属第一医院 安徽省立医院 口腔医学中心 安徽 合肥 230001;

2. 山东大学口腔医学院牙周科 山东 济南 250012;

3. 山东省口腔组织再生重点实验室 山东 济南 250012)

[摘要] 转谷氨酰胺酶 2(transglutaminase 2, TG2) 又称组织型转谷氨酰胺酶, 是广泛分布、具有多种生物学功能的蛋白交联酶, 近年来研究发现 TG2 表达异常与体内多种疾病的发生相关, 并成为这些疾病药物治疗的潜在新靶点, 但 TG2 在口腔疾病中的作用还鲜见报道。本文就 TG2 在慢性牙周炎、药物性牙龈增生及口腔黏膜下纤维化中的作用作一综述, 以期对口腔疾病的治疗提供新的思路。

[关键词] 转谷氨酰胺酶 2 慢性牙周炎 药物性牙龈增生 口腔黏膜下纤维化病变

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2018)06—0585—03

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.06.002

Research Progress about the Role of Transglutaminase 2 in Oral Diseases. HUANG Hai—yan¹, SONG Ai—mei^{2,3*}, SUN Qin—feng^{2,3*}. 1. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of USTC (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230001, China; 2. Department of Periodontology, School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China; 3. Shandong Provincial Key Laboratory of Oral Tissue Regeneration, Jinan 250012, China.

[Abstract] Transglutaminase 2 (TG2), also known as tissue transglutaminase, is a widely distributed, protein cross—linking enzyme with multiple biochemical functions. TG2 has been reported to involve in etiopathogenesis of several pathological conditions and the inhibition of enzyme activity is potential for therapeutic management of these diseases. However, there is no review on the relationship between TG2 and oral diseases. In this paper, the role of TG2 in three oral diseases, including chronic periodontitis, drug induced gingival overgrowth, and oral submucous fibrosis is reviewed, which is to provide a new insight to the therapy of some oral diseases.

[Key words] Transglutaminase 2 Chronic periodontitis Drug induced gingival overgrowth Oral submucous fibrosis

转谷氨酰胺酶 2(transglutaminase 2, TG2) 是转谷氨酰胺酶家族(transglutaminases, TGs) 中唯一广泛表达于机体组织中的一类高度复杂的钙离子依赖性多功能蛋白, 体内几乎所有细胞均可不同程度表达。它可以发挥转氨酶、三磷酸鸟苷酶/二磷酸鸟苷酶(guanosine triphosphatase / guanosine diphosphatase, GTPase/GDPase)、蛋白二硫化异构酶、蛋白激酶等功能。TG2 与多种细胞蛋白非共价键相互作用, 在细胞的粘附、转移、生长、凋亡、分化等方面起到了重要作用^[1], 与某些全身疾病的发生发展密切相关, 如乳糜泻病、糖尿病、神经退行性变、Alzheimer 症和帕金森病等。近年来研究发现 TG2 与一些口腔疾病密切相关, 有可能为

这些口腔疾病的治疗提供新的靶点。

1 TG2 生物学功能

人 TG2 分子包含 687 个氨基酸残基, 分子量约为 80 000。编码人 TG2 的单基因 TGM2 定位于 20 号染色体的 q11~12 带上, 全长约 32.5 kb。其在细胞外基质及细胞表面均有表达, 并且在细胞内 TG2 主要存在于胞浆中, 同时核膜及线粒体中也能检测到少量表达。

1.1 TG2 的转氨酶作用 TG2 催化 Ca²⁺ 依赖的氨基转移反应, 形成含有谷氨酸和赖氨酸[N—ε(γ—glutamyl)lysine] 交联的异构肽链或共价结合的蛋白质, 引起蛋白质的转录后修饰。目前研究认为 TG2 的转氨酶活性是分两步进行的, 首先其半胱氨酸活性位点的硫键(Cys277) 作为亲核离子攻击谷氨酸侧链的 γ—羧基, 形成 S 醚键, 同时释放 NH₃, 而后谷氨酰胺残基的 γ—羧基与赖氨酸残基的 ε—氨基形成异肽键。转氨酶作用形成的异肽键促进了蛋白交联, 由于更大的分子量和 N—ε(γ—glutamyl)lysine 交联对蛋白水解酶

作者简介 黄海燕(1991~), 女, 安徽人, 硕士, 主要从事牙周病病因学研究。

* **通讯作者** 宋爱梅, E—mail: sam1972@sdu.edu.cn

孙钦峰, E—mail: sunqinfeng@sdu.edu.cn

的抵制,经过 TGs 催化形成的蛋白质具有更大稳定性和强度^[2],增加了新蛋白对物理及化学作用的抵抗力,在细胞外基质的重塑与稳定中起重要作用。TG2 的转氨基酶作用在细胞凋亡中也有促进的功能。Milakovic 等^[3]和 Gundemir 等^[4]研究结果表明,生理条件下 TG2 转氨基活性处于静止状态,其对细胞凋亡发挥保护性作用,当 TG2 的转氨基活性被激活之后,其对细胞的程序性死亡比较敏感,促进细胞进入程序化的死亡过程。

1.2 TG2 的 GTPase/ATPase 功能 TG2 能与三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)或者三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)以 1:1 结合并将其水解^[5]。当 TG2 与鸟嘌呤核苷酸结合后,其转氨基活性受到抑制^[6]。这是因为细胞内 Ca^{2+} 使 TG2 形成一种开放的活化状态,暴露其转氨基酶的活性位点,而 GTP、ATP 则诱导 TG2 的三维结构转向相反的关闭状态,而且结合了 GTP 的 TG2 更加稳定,增加了 TG2 由基态转变为中间态的自由能,使 TG2 的转谷氨酰胺活性中心更难暴露,从而 GTP 或者 ATP 能抑制 TG2 催化蛋白质交联的活性^[7]。

1.3 TG2 的激酶功能及蛋白二硫化异构酶功能 Mishra 等^[8]发现与细胞生存相关的主要信号因子蛋白激酶(protein kinases, PKs)可以调节 TG2 及其他转谷氨酰胺酶家族成员,如被蛋白激酶 A (protein kinases A, PKA) 磷酸化的 TG2,其转氨基活性被抑制,但是却增加了其激酶活性。虽然体外实验已经证实了 TG2 的激酶功能,但是其在体内如何表现激酶功能及是否在正常生理状态下表现,都是仍待解决的问题^[9]。相比于激酶, TG2 的蛋白二硫化物异构酶的活性则更为明确,其活性不需要 Ca^{2+} 催化也不会受核酸结合的抑制。在线粒体中, TG2 的蛋白二硫化物异构酶的活性可能对稳定呼吸复合物有重要作用,因此缺少或者上调 TG2 之后,线粒体功能及 ATP 功能的稳定性均可能受到影响^[10]。

2 TG2 与口腔疾病

由于 TG2 表达的广泛性及功能的多样性,近年来学者们开始重视其与口腔疾病的关系,目前研究表明主要有以下 3 种口腔疾病与 TG2 异常表达有关。

2.1 TG2 与慢性牙周炎 慢性牙周炎(Chronic periodontitis, CP)是发生在牙周支持组织的慢性炎症性疾病,表现为牙周袋形成、牙槽骨吸收等进行性破坏,其发病因素包括细菌和宿主免疫反应,具体发病机制还有待阐明。近年研究发现 TG2 在牙周炎发病过程中发挥着一定作用, Matarese 等^[11]体外培养慢性牙周炎患者及牙周健康志愿者的牙周膜成纤维细胞,发现牙周炎组较健康对照组的 TG2 mRNA 表达水平升高 7 倍, TG2 转氨基酶活性增加 36%;另外还发现实验组中炎症因子核因子 κB 受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κB ligand, RANKL)的 mRNA 转录水平增高 2.5 倍,加入 TG2 抑制剂 R283 后,则 RANKL 表达降低, RANKL/骨保护素(osteoprotegerin, OPG)的比值与 TG2 水平呈正相关^[12]。因此,作者认为牙

周膜细胞中 TG2 表达与高浓度的前炎症因子有关,促进了骨吸收和骨重建,表明 TG2 参与了 CP 发病。

TG2 除了参与牙周炎的发展过程,其促进大分子粘附的特性还与牙周炎发病过程中细菌粘附有关。牙周炎的始动因素是菌斑,细菌粘附在菌斑形成、病变进展过程中发挥重要作用。最近研究表明,细胞表面 TG2 在抑制牙周致病菌向宿主细胞的粘附中可能发挥重要作用。牙龈沟内上皮的完整性是防止细菌入侵的天然屏障,在牙龈炎的初期,沟内上皮水肿,细菌侵入。Boisvert 等^[13]利用人喉癌上皮细胞系研究发现在共聚焦显微镜下人喉癌上皮细胞表面牙龈卟啉单胞菌(*porphyromonas gingivalis*, Pg)与 TG2 共存,在细菌粘附位点上可以看到成簇的 TG2 的存在,通过 RNA 干扰,沉默 HEp-2 细胞相关基因,阻断 TG2 的表达,发现 Pg 对宿主细胞的粘附能力明显降低。另外,通过体外合成具有 TG2 抑制功能的多肽片段的复合体 P3,加入到 HEp-2 细胞培养基中,明显抑制了 Pg 与 HEp-2 细胞的结合。以上研究结果表明 TG2 与 Pg 粘附密切相关,由于 Pg 是牙周炎发病中的重要致病菌,如果用 TG2 的抑制剂降低 Pg 的粘附,那么将为牙周炎的药物治理提供新的思路。

然而,若以牙龈上皮细胞做为牙周炎发病的研究对象,研究者则认为并非 TG2 作用重要,而是 TGs 家族酶谱的表达改变在牙龈慢性损伤和适应性重建愈合中起到了重要的调控作用。Curro 等^[12]研究了 22 例 CP 患者及 22 例健康者的牙龈组织中转谷氨酰胺酶的改变,采用实时定量聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)方法检测了牙龈组织中 TG1、TG2、TG3 及凝血因子Ⅲ和基质金属蛋白酶-9 的基因水平,发现 CP 组较对照组 TG1 和 TG3 基因表达明显降低,而 TG2 基因表达改变则不明显。考虑到牙龈上皮在牙周病发生、发展的重要作用,作者认为 TGs 家族酶谱在牙龈组织中的表达改变而非 TG2 促进了牙龈炎症的发生发展。

2.2 TG2 与药物性牙龈增生 药物性牙龈增生(drug-induced gingival overgrowth, DIGO)是因长期服用抗癫痫药、钙通道阻滞剂或者免疫抑制剂而引起的牙龈纤维性增生和体积完全或部分肥大,以牙龈结缔组织中细胞外基质堆积为特点,尤其是各类胶原成分的堆积。Asioli 等^[14]收集服用环孢素 A 的肝移植患者增生的牙龈组织与健康人牙龈组织,通过免疫组织化学的方法发现实验组较对照组基质成分中 TG2 的表达有 2~6 倍的增多。Lee 等^[15]通过体外实验培养人牙龈成纤维细胞,发现环孢素 A 刺激的牙龈成纤维细胞 TG2 表达上调,并证明其与细胞内活性氧水平呈正相关。

关于 TG2 表达升高促进 DGO 发病的机制,研究认为与 TG2 的转氨基酶活性密切相关。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是目前公认的关键致纤维化因子之一,在 DIGO 中的促进作用已经得到认可,而 TG2 可以将大量未激活状态的 TGF- β 1 结合蛋白-1(latent TGF- β 1 binding protein-1, LTBP-1)通过蛋白交联

与细胞外基质蛋白整合,激活其功能,从而促进了 TGF- β 的致纤维化作用^[16]。

2.3 TG2 与口腔黏膜下纤维性变 口腔黏膜下纤维性变(oral submucous fibrosis, OSF)是一种慢性炎症且具有癌变倾向的口腔黏膜疾病。尽管流行病学研究发现咀嚼槟榔与 OSF 的发生密切相关,但其发病机制尚未明确。目前有研究认为,槟榔碱可刺激细胞内活性氧簇生成增加,细胞内活性氧簇可以激活细胞表面 TG2 的表达, TG2 表达上调将导致结缔组织中细胞外基质的沉积^[17]。Lee 等^[18]对 40 例 OSF 患者和 10 例健康人类黏膜标本进行研究,采用免疫组织化学检测后发现实验组 TG2 的表达明显高于对照组,槟榔碱刺激健康人类黏膜成纤维细胞后, TG2 蛋白呈剂量依赖性表达增加。从而认为 TG2 在 OSF 的发病中发挥了重要作用。

3 展望

TG2 在各类型细胞中的表达、特异性的分子构像及广泛结合的底物是其具有多种生物学功能的基础, TG2 催化的不可逆蛋白交联反应在一些口腔疾病中起到重要作用,但是对于多功能酶 TG2 在口腔疾病的起始及发展的分子机制尚未明确,如 CP 中 TG2 表达增高的始动因子是什么? TG2 在 DIGO 中是否对上皮细胞有作用及分子机制等。通过 TG2 的作用机制和安全无毒的 TG2 活性抑制剂地深入研究,将会为以 TG2 为靶点的药物治疗相关口腔疾病提供更好的理论依据,逐步实现 OSF、DIGO 等疾病的针对性药物治疗。

参考文献

- [1] Nurminskaya MV, Belkin AM. Cellular functions of tissue transglutaminase [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, 294 : 1-97
- [2] Esposito C, Caputo I. Mammalian transglutaminases. Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance [J]. *FEBS J*, 2005, 272 (3) : 615-631
- [3] Milakovic T, Tucholski J, McCoy E, et al. Intracellular localization and activity state of tissue transglutaminase differentially impacts cell death [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (10) : 8715-8722
- [4] Gundemir S, Johnson GV. Intracellular localization and conformational state of transglutaminase 2: implications for cell death [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7) : e6123
- [5] Feng JF, Rhee SG, Im MJ. Evidence that phospholipase delta1 is the effector in the Gh (transglutaminase II)-mediated signaling [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271 (28) : 16451-16454
- [6] Achyuthan KE, Greenberg CS. Identification of a guanosine triphosphate-binding site on guinea pig liver transglutaminase. Role of GTP and calcium ions in modulating activity [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(4) : 1901-1906

- [7] Di Venere A, Rossi A, De Matteis F, et al. Opposite effects of Ca²⁺ and GTP binding on tissue transglutaminase tertiary structure [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(6) : 3915-3921
- [8] Mishra S, Melino G, Murphy LJ. Transglutaminase 2 kinase activity facilitates protein kinase A-induced phosphorylation of retinoblastoma protein [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(25) : 18108-18115
- [9] Gundemir S, Colak G, Tucholski J, et al. Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(2) : 406-419
- [10] Mastroberardino PG, Farrace MG, Viti I, et al. "Tissue" transglutaminase contributes to the formation of disulphide bridges in proteins of mitochondrial respiratory complexes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(9-10) : 1357-1365
- [11] Matarese G, Curro M, Isola G, et al. Transglutaminase 2 up-regulation is associated with RANKL/OPG pathway in cultured HPDL cells and THP-1-differentiated macrophages [J]. *Amino Acids*, 2015, 47(11) : 2447-2455
- [12] Curro M, Matarese G, Isola G, et al. Differential expression of transglutaminase genes in patients with chronic periodontitis [J]. *Oral Dis*, 2014, 20(6) : 616-623
- [13] Boisvert H, Lorand L, Duncan MJ. Transglutaminase 2 is essential for adherence of *Porphyromonas gingivalis* to host cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(14) : 5355-5360
- [14] Asioli S, Righi A, Cardone P, et al. Transglutaminase 2 expression is significantly increased in cyclosporine-induced gingival overgrowth [J]. *Histol Histopathol*, 2011, 26(11) : 1399-1404
- [15] Lee SS, Tsai CH, Kuan YH, et al. The upregulation of transglutaminase-2 by cyclosporin a in human gingival fibroblasts is augmented by oxidative stress [J]. *J Periodontol*, 2013, 84(10) : 1469-1475
- [16] Telci D, Collighan RJ, Basaga H, et al. Increased TG2 expression can result in induction of transforming growth factor beta1, causing increased synthesis and deposition of matrix proteins, which can be regulated by nitric oxide [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(43) : 29547-29558
- [17] Lee ZW, Kwon SM, Kim SW, et al. Activation of in situ tissue transglutaminase by intracellular reactive oxygen species [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(3) : 633-640
- [18] Lee SS, Chen YJ, Tsai CH, et al. Elevated transglutaminase-2 expression mediates fibrosis in areca quid chewing-associated oral submucosal fibrosis via reactive oxygen species generation [J]. *Clin Oral Investig*, 2016, 20(5) : 1029-1034

[收稿日期: 2017-01-10]

(本文编辑 关隽)