

[文章编号] 1000-1182(2007)01-0075-04

· 专栏论著 ·

人牙髓细胞与牙龈成纤维细胞差异表达基因的克隆及特征分析

王忠东¹, 吴纪楠², 周琳², 凌均桢¹, 郭希民³, 肖明振⁴, 朱峰⁵, 蒲勤⁵, 柴玉波⁵, 赵忠良⁵

(1.中山大学光华口腔医院 牙体牙髓科, 广东 广州 510055; 2.广东省中山市人民医院 口腔医疗中心, 广东 中山 528400;

3.军事医学科学院 基础医学研究所, 北京 100850; 4.第四军医大学口腔医院 牙体牙髓科;

5.第四军医大学 基础部, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 批量克隆人牙髓细胞(HDPC)与人牙龈成纤维细胞(HGF)的差异表达基因并对其特征进行分析, 研究HDPC的生物学特性。方法 体外培养HDPC和HGF, 应用基于PCR的改良消减杂交技术构建HDPC和HGF的cDNA消减文库, 批量克隆HDPC和HGF的差异表达基因并测序, 使用GenBank的BLAST对测序结果进行同源序列比较。结果 经过序列测定, 获得12个差异表达基因的序列, 经BLAST分析有2个为未知基因。在已知基因中, 含有4个与细胞信号转导机制相关的基因; 2个与细胞转运机制相关的基因(包括细胞膜及细胞核膜转运); 2个与细胞RNA剪接机制相关的基因。结论 HDPC的生物学特性是由某些特定基因的差异表达所决定的, 其生长、分化机制可能与相对旺盛的蛋白合成及分泌活性相关。

[关键词] 牙髓细胞; 牙龈成纤维细胞; 差异表达; 消减文库

[中图分类号] R781.3 [文献标识码] A

Cloning and Characterization of Genes Differentially Expressed in Human Dental Pulp Cells and Gingival Fibroblasts WANG Zhong-dong¹, WU Ji-nan², ZHOU Lin², LING Jun-qi¹, GUO Xi-min³, XIAO Ming-zhen⁴, ZHU Feng⁵, PU Qin⁵, CHAI Yu-bo⁵, ZHAO Zhong-liang⁵. (1. Dept. of Endodontics, Guanghua College of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China; 2. Dental Care Center, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528400, China; 3. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 4. Dept. of Endodontics, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 5. Dept. of Basic Medical Sciences, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] Objective To study the biological properties of human dental pulp cells (HDPC) by cloning and analysis of genes differentially expressed in HDPC in comparison with human gingival fibroblasts (HGF). Methods HDPC and HGF were cultured and identified by immunocytochemistry. HDPC and HGF subtractive cDNA library was established by PCR-based modified subtractive hybridization, genes differentially expressed by HDPC were cloned, sequenced and compared to find homogeneous sequence in GenBank by BLAST. Results Cloning and sequencing analysis indicate 12 genes differentially expressed were obtained, in which two were unknown genes. Among the 10 known genes, 4 were related to signal transduction, 2 were related to trans-membrane transportation (both cell membrane and nuclear membrane), and 2 were related to RNA splicing mechanisms. Conclusion The biological properties of HDPC are determined by the differential expression of some genes and the growth and differentiation of HDPC are associated to the dynamic protein synthesis and secretion activities of the cell.

[Key words] dental pulp cell; gingival fibroblast; differential expression; subtractive hybridization

人牙髓细胞(human dental pulp cell, HDPC)是牙髓组织的主体细胞, 担负着牙齿的营养、代谢、

感觉和修复等方面的重要生理功能。牙髓组织在损伤、感染情况下, 具有自身修复能力的生物学基础^[1]。关于其再生、分化机制的研究一直是近年来牙髓生物学的一个重要研究内容。HDPC具有区别于其他成纤维细胞的特性, 即HDPC具有分化为成牙本质细胞进而形成牙本质的能力, 而具有同样胚胎起源的牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblast, HGF)

[收稿日期] 2006-11-08; [修回日期] 2006-12-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471889)

[作者简介] 王忠东(1969-), 男, 黑龙江人, 讲师, 博士, 现在广东省中山市人民医院博士后科研工作站工作

[通讯作者] 王忠东, Tel: 0760-8387803

并不具备这种能力。基因表达的变化处于控制生物学调节的中心位置^[2]。因此,了解细胞差异基因的表达,有助于阐明生命的奥秘;同时,亦可以提示造成两种细胞表型差异的遗传学基础。本实验在构建HDPC与HGF cDNA消减文库的基础上,进一步批量克隆HDPC与HGF的差异表达基因并对其特征进行分析,在分子水平上研究牙髓细胞的生物学特性,以期为牙髓细胞生长、分化机制的最终阐明提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 HDPC与HGF的培养^[3]

在第四军医大学口腔医院门诊取年龄10~20岁患者因正畸需要而拔除的健康恒牙20颗,并切取小块牙龈分别立即置于含抗生素预冷的Hank s液中带回实验室,采用常规组织块法进行培养。培养液为含15%胎牛血清的DMEM,培养条件为5%CO₂37℃,饱和湿度。培养的HDPC与HGF经抗波形丝蛋白、角蛋白单抗ABC法染色,以鉴定其细胞起源。存活后进行传代培养,细胞传代至第4~10代细胞,待细胞呈对数生长并达到80%覆盖率时,收集细胞,立即进行总RNA提取。

1.2 HDPC与HGF cDNA消减文库的构建及差异表达基因的克隆、鉴定

HDPC与HGF cDNA消减文库的构建及差异表达

基因的克隆、鉴定参见文献[4]。

1.3 序列测定及BLAST分析

纯化所选取的含有人牙髓细胞差异表达基因片段cDNA克隆,均以正向引物(T₇)为测序引物,按说明进行测序反应。测序后,通过国际互联网(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)在GenBank序列数据库进行同源基因搜索,同GenBank最新的数据库(2000年1月31日)进行同源比较、分析。

2 结果

将20个人牙髓细胞差异表达基因片段cDNA克隆均以反向引物(SP6)为测序引物进行序列测定,由于种种原因,克隆P35、P37、P73、P015、P045、P046测序失败。反向测序结果与正向测序结果对接后获得全长克隆序列,应用BLAST软件进行分析,序列的BLAST初步分析结果如表1。根据测序及BLAST分析结果,发现14个序列中,除1个为载体序列外,有10个已知基因序列(其中P93和P83为重复测定的序列),另有2个可能为新基因。所得到的10个已知基因cDNA片段,其中含有4个与细胞信号转导机制相关的基因,2个与细胞转运机制相关的基因(包括细胞膜及细胞核膜转运),2个与细胞RNA剪接机制相关的基因,1个Ⅰ型胶原 1前体基因,1个NADP依赖的异柠檬酸脱氢酶基因。

表 1 HDPC差异表达片段cDNA克隆的BLAST分析结果
Tab 1 BLAST analysis of differential expressed cDNA of HDPC

序号	片段大小(bp)	BLAST结果	结构及功能特点
P4	724	Homosapiens mRNA for surface glycoprotein	一种人表面糖蛋白,其功能尚未明确。Yaspo等 ^[5] 1998年研究发现,该蛋白为一种细胞膜表面蛋白分子,其功能可能与细胞膜表面的信号转导或细胞转运机制(trafficking mechanism)有关
P35		无法判断结果	
P37		无法判断结果	
P41	722	Homosapiens PRP4/STK/WD splicingfactor	U4/U6- snRNP类型的剪接因子 ^[6] 。snRNP 是由数种snRNA (small nuclear RNA)和几十种蛋白质构成的细胞核微小核糖核蛋白颗粒
P46	383	Homosapiens TNF receptor- associated factor6 (TRAF6)	肿瘤坏死因子受体相关因子- 6 (TRAF6) ^[7] 。TRAF蛋白家族成员。被认为在肿瘤坏死因子受体超家族活化转录因子NF- kappaB过程中起作用
P56	700	Human mRNA for DNA polymerase beta	DNA聚合酶- ^[8] 是真核细胞中最小的DNA聚合酶,其DNA序列高度保守。主要参与DNA修复。其缺陷与肿瘤的发生有关 ^[9] 。同时,可能在胚胎发育过程中起重要作用 ^[10]
P73		无法判断结果	
P79	441	Homosapiens karyopherin alpha 2(RAG cohort 1, importin alpha 1)(KPNA2)	核孔复合体(nuclear pore complex)在胞核的内外双向运输中发挥重要作用。可能参与了蛋白质的核转导过程 ^[11-13] 。也可能在V(D)J重组中起作用 ^[13]

续表1

序号	片段大小(bp)	BLAST结果	结构及功能特点
P82	814	Homosapiens eukaryotic translation initia	人真核细胞翻译起始因子4A2。它由407个氨基酸组成,定位于染色体18p11.2,DEAD-box基因超家族,主要功能是参与mRNA结合到核糖体的过程 ^[14]
P83	552	Anopheles anthropophagus DNA for internal transcribed spacer 2 region	按蚊核糖体DNA内转录间隔2区序列(ITS2)。核糖体DNA(rDNA)是编码核糖体RNA(rRNA)的基因,其中第2内转录间隔区(ITS2)序列具有种间变异的特点,已广泛用于亲缘种的鉴别 ^[15]
P97	547	可能为P83	
P012	805	可能是新的	
P014	710	载体重组	
P015		无法判断结果	
P016	801	Homosapiens collagen, type , alpha 1	型胶原 1前体。型胶原由3条 1()链所组成 ^[16]
P029	914	可能是新的	
P038	802	Homosapiens NADP- dependent socitra	NADP依赖的异柠檬酸脱氢酶。这是三羧酸循环过程中的一种重要限速酶 ^[17]
P045		无法判断结果	
P046		无法判断结果	
P049	556	Homosapiens 1.55 x10 ⁵ RNA binding protein mRNA	人1.55 x10 ⁵ RNA结合蛋白。是人核微小核糖蛋白颗粒的组分之一,在RNA的剪接中发挥重要作用 ^[18]
		Homosapiens clone 557 OTK27 mRNA	一种EST标签 ^[19] 。其序列有1 493 bp,包括一个384 bp的开放读框。定位于染色体12q24.3区。该蛋白对细胞存活有重要的生理功能

3 讨论

体外培养的牙髓细胞呈梭形,表现为成纤维样细胞,但其生物学特性却有区别于一般成纤维细胞的特殊性。最显著的特点就是其具备分化为成牙本质细胞,进而形成修复性牙本质的能力;而牙龈成纤维细胞虽与牙髓细胞在胚胎起源上同来自中胚层,却不具备这种分化潜能^[5]。本实验基于两者之间的这种差别,应用基于PCR的改良消减杂交技术克隆人牙髓细胞的特异表达基因,成功地获得了含有人牙髓细胞差异表达片段cDNA克隆20个,并进行了序列测定,将其在GenBank序列数据库进行同源基因搜索。结果表明:共有10个克隆为已知基因序列,另有2个克隆(Clone P012和Clone P029)在GenBank序列数据库中未发现同源基因,推测它们可能为新的基因。

在克隆人牙髓细胞和人牙龈成纤维细胞差异表达基因的实验过程中,所得到的10个已知基因cDNA片段,其中含有4个与细胞信号转导机制相关的基因,2个与细胞转运机制相关的基因(包括细胞膜及细胞核膜转运),2个与细胞RNA剪接机制相关的基因。所得到的4个与细胞信号转导机制相关的基因中,P4和P41分别与一种人表面糖蛋白和U4/U6-snRNP类型的剪接因子同源。前者整合在细胞膜上,为含有许多具有信号转导功能的细胞表面分子所具

有的四肽结构YXRF;后者含有与G蛋白 亚基相似的结构,由于人牙髓细胞区别于人牙龈成纤维细胞的生物学特性,提示它们可能与入牙髓细胞生长、分化的调控机制有关。P46和 P79分别与肿瘤坏死因子受体相关因子-6和KPNA2同源。肿瘤坏死因子受体相关因子-6参与IL-1的信号传递过程,后者在淋巴细胞V(D)J重组中起作用^[13]。众所周知,牙髓组织的免疫防御系统在维持牙髓组织的正常生理状态及免疫防御机制中发挥重要作用^[1]。IL-1是最早在牙髓组织中研究、发现的细胞因子,在牙髓组织的生理、炎症状态下均发挥重要作用^[1,20]。由此可见,参与牙髓组织防御机制的不仅仅是其防御细胞,牙髓细胞自身在其中亦可能具有重要意义。同时,P4和P79所编码的蛋白还与细胞膜及核膜内外物质的转运有关,至于转运何种物质,转运机制如何,有待进一步的研究、探讨。

与细胞RNA剪接机制直接相关的基因有P41和P049。它们所编码的蛋白分别是SnRNP的组成成分,具有剪接RNA分子的作用。一个非常有趣的现象是,所克隆的P83与按蚊的一个基因序列高度同源,为编码核糖体RNA(rRNA)的基因。目前,尚没有相关的文献报道,需要进一步的工作来证实。

另外,发现人牙髓细胞和人牙龈成纤维细胞的差异表达基因还有 型胶原 1前体、DNA聚合酶-真核细胞翻译起始因子4A2和NADP依赖的异柠

柠檬酸脱氢酶。尽管有文献报道, 型胶原可作为细胞发育的一种表型特征^[16], DNA聚合酶- 可能在胚胎发育过程中起重要作用^[10], 但尚缺乏足够的证据表明它们在人牙髓细胞中特异表达。至于在两者之间表达的差异, 可能有两方面的因素。与实验所采用细胞模型中细胞所处的状态和细胞特性直接相关; 当然具体的相关性如何, 尚需进一步的实验证实。实验方法自身的局限性, 与实验手段的扣除效率有关。

对于2个新的基因序列, 将其分别命名为DPDP- 2和DPDP- 3, 目前, 它们已被GenBank收录, 其收录号分别为AF268385和AF268386。根据所选择细胞模型的特点以及在实验中所获得的已知基因的功能特点分析, 推测它们可能与HDPC的生长、分化机制相关, 但有待进一步的研究。

【参考文献】

- [1] 王忠东, 文玲英. 牙髓自身修复潜能的研究进展[J]. 国外医学口腔医学分册, 1996, 23(2) :65- 67.
(WANG Zhong-dong, WEN Ling-ying. Progress in the self-regenerative potential of dental pulp[J]. Foreign Medical Sciences (Stomatology), 1996, 23(2) :65- 67.)
- [2] McClelland M, Mathieu DF, Welsh J. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR[J]. Trends Genet, 1995, 11(6) :242- 246.
- [3] 吴军正, 司徒镇强, 陈建元, 等. 体外培养的人牙龈牙周膜牙髓纤维细胞生长特点[J]. 实用口腔医学杂志, 1993, 9(4) :227- 229.
(WU Jun-zheng, SI-TU Zhen-qiang, CHEN Jian-yuan, et al. Growth and morphology characterization of fibroblasts derived from gingival, periodontal ligament and pulp in vitro[J]. J Pract Stomatol, 1993, 9(4) :227- 229.)
- [4] 郭希民, 吴补领, 肖明振, 等. 人牙周膜成纤维细胞与牙龈成纤维细胞差异表达一条新基因的克隆[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2000, 10(6) :343- 346.
(GUO Xi-min, Wu Bu-ling, XIAO Ming-zhen, et al. Cloning of a new gene expressed differently in human periodontal ligament fibroblast in comparison with gingival fibroblasts[J]. Chin J Conserv Dent, 2000, 10(6) :343- 346.)
- [5] Yaspo ML, Aaltonen J, Horelli-Kuitunen N, et al. Cloning of a novel human putative type Ia integral membrane protein mapping to 21q22.3[J]. Genomics, 1998, 49(1) :133- 136.
- [6] Horowitz DS, Kobayashi R, Krainer AR. A new cyclophilin and the human homologues of yeast Prp3 and Prp4 form a complex associated with U4/U6 snRNPs[J]. RNA, 1997, 3(12) :1374- 1387.
- [7] Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, et al. TRAF6 is a signal transducer for interleukin- 1[J]. Nature, 1996, 383(6599) :443- 446.
- [8] Wang L, Patel U, Ghosh L, et al. DNA polymerase beta mutations in human colorectal cancer[J]. Cancer Res, 1992, 52(17) :4824- 4827.
- [9] Weis K, Mattaj JW, Lamond AI. Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences[J]. Science, 1995, 268(5213) :1049- 1053.
- [10] 冯朝晖, 余应年. 真核细胞DNA聚合酶[J]. 国外医学分子生物学分册, 1998, 20(5) :227- 231.
(FENG Zhao-hui, YU Ying-nian. DNA polymerase of eukaryotic cells[J]. Foreign Medical Sciences in Molecular Biology, 1998, 20(5) :227- 231.)
- [11] Fischer N, Kremmer E, Lautscham G, et al. Epstein-barr virus nuclear antigen1 forms a complex with the nuclear transporter karyopherin alpha2[J]. J Biol Chem, 1997, 272(7) :3999- 4005.
- [12] Seki T, Tada S, Katada T, et al. Cloning of a cDNA encoding a novel importin-alpha homologue, Qip1: Discrimination of Qip1 and Rch1 from hSrp1 by their ability to interact with DNA helicase Q1/RecQL[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 234(1) :48- 53.
- [13] Cuomo CA, Kirch SA, Gyuris J, et al. Rch1, a protein that specifically interact with the RAG- 1 recombination-activating protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(13) :6156.
- [14] 孙耕耘, 毛宝龄, 吕宝璋. 白细胞介素- 1、肿瘤坏死因子与炎症[J]. 生理科学进展, 1993, 24(1) :23.
(SUN Geng-yun, MAO Bao-ling, LV Bao-zhang. Interleukin- 1, tumor necrosis factor and inflammation[J]. Progress in Physiological Science, 1993, 24(1) :23.)
- [15] 马雅军, 瞿逢伊, 徐建农, 等. 中华按蚊和嗜人按蚊rDNA内转录间隔2区序列差异[J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(3) :234- 236.
(MA Ya-jun, QU Feng-yi, XU Jian-nong, et al. Sequence differences of ribosomal DNA second internal transcribed spacer between anopheles sinensis and anopheles anthropophagus (Diptera: Culicidae)[J]. Acad J Sec Mil Univ, 1998, 19(3) :234- 236.)
- [16] Nekrutenko A, Hillis DM, Patton JC, et al. Cytosolic isocitrate dehydrogenase in humans, mice, and voles and phylogenetic analysis of the enzyme family[J]. Mol Biol Evol, 1998, 15(12) :1674- 1684.
- [17] 谭曾鲁, 周柔丽. 医学细胞生物学[M]. 北京: 北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1992 :55.
(TAN Zeng-lu, ZHOU Rou-li. Medical cell biology[M]. Beijing: Joint Press of Beijing Medical University and China Union Medical University, 1992 :55.)
- [18] Nottrott S, Hartmuth K, Fabrizio P, et al. Functional interaction of a novel 15.5 kD(U4/U6.U5) tri-snRNP protein with the 5-stem-loop of U4 snRNA[J]. EMBO J, 1999, 18(21) :6119- 6133.
- [19] Saito H, Fujiwara T, Shin S, et al. Cloning and mapping of a human novel cDNA(NHP2L1) that encodes a protein highly homologous to yeast nuclear protein NHP2[J]. Cytogenet Cell Genet, 1996, 72(2/3) :191- 193.
- [20] 赵勇, 丁金凤. 寻找差异表达基因[J]. 国外医学遗传学分册, 2000, 23(2) :76.
(ZHAO Yong DING Jin-feng. Searching for differentially expressed genes[J]. Foreign Medical Sciences in Genetics, 2000, 23(2) :76.)

(本文编辑 汤亚玲)