

Vps4b 基因敲除鼠上皮根鞘中细胞角蛋白 14 和增殖细胞核抗原的表达

田晴¹ 王莹莹² 李强¹ 陈栋¹

1. 郑州大学第一附属医院 河南省口腔医院口腔科, 郑州 450052;

2. 徐州市中心医院口腔科, 徐州 221009

[摘要] 目的 研究 Vps4b 基因突变对上皮根鞘 (HERS) 中细胞角蛋白 14 (CK14) 和增殖细胞核抗原 (PCNA) 表达的影响。方法 取出生后 (P) 5、9、11、15、19 d 的小鼠的两侧下颌组织, 石蜡包埋后获得下颌第一磨牙组织切片, 通过免疫组织化学方法比较 CK14 和 PCNA 在正常小鼠与 Vps4b 基因敲除小鼠 HERS 中的表达情况。结果 正常小鼠 P5 d 开始形成 HERS, PCNA 在 HERS 细胞中强阳性表达; P9 d, HERS 结构连续, PCNA 在 HERS 细胞中阳性表达; P11 d, 一小部分 HERS 开始断裂, PCNA 在 HERS 细胞中弱阳性表达; P15 d, HERS 继续断裂, PCNA 在牙根表面 HERS 细胞中弱阳性表达; P19 d, 牙根达到生理长度, PCNA 仅在牙根末端 HERS 细胞中阳性表达。基因敲除小鼠与正常小鼠相比, P5 d 同样形成 HERS 结构, 然而其断裂在 P9 d 就开始出现, P19 d 牙根表面仅存少量 HERS 碎片, 根尖发育不成熟, PCNA 表达强度下降。结论 Vps4b 基因突变可能通过改变 HERS 中 CK14 和 PCNA 的表达, 从而导致牙根发育异常。

[关键词] Vps4b 基因; 上皮根鞘; 细胞角蛋白 14; 增殖细胞核抗原; 基因敲除

[中图分类号] Q 78 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2021.03.005



开放科学 (资源服务)
标识码 (OSID)

Expressions of cytokeratin 14 and proliferating cell nuclear antigen in the Hertwig's epithelial root sheath of a Vps4b knockout mouse Tian Qing¹, Wang Yingying², Li Qiang¹, Chen Dong¹. (1. Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan Provincial Stomatological Hospital, Zhengzhou 450052, China; 2. Dept. of Stomatology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou 221009, China)

Supported by: Key Research and Development Project of Henan Province (Science and Technique Project) (22170124); Medical Science and Technique Project of Henan Province (SBGJ2018038). Correspondence: Chen Dong, E-mail: fccchend@zzu.edu.cn.

[Abstract] **Objective** The effect of Vps4b gene mutation on the expressions of cytokeratin 14 (CK14) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the Hertwig's epithelial root sheath (HERS) is investigated. **Methods** The bilateral mandibular tissues of mouse on postnatal days 5, 9, 11, 15, and 19 were removed. The mandibular first molar tissue sections were obtained after paraffin embedding. The CK14 and PCNA expressions in the epithelial root sheath of the normal mouse and Vps4b knockout mouse were compared through immunohistochemistry. **Results** On postnatal day 5, the normal mouse began to form HERS and had a strong positive PCNA expression in the HERS cells; on postnatal day 9, the HERS structure was continuous, and PCNA was positive in the HERS cells; on postnatal day 11, a small portion of HERS began to break, and PCNA was weakly positive in the HERS cells; on postnatal day 15, HERS continued to fracture; PCNA was weakly and positively expressed in the HERS cells on the root surface; on postnatal day 19, the tooth

root reached normal physiological length, and PCNA was positively expressed in the HERS cells of the terminal part. Similar to the normal mouse, the gene knockout mouse also formed a HERS structure on postnatal day 5. However, HERS began to break on postnatal day 9. On

[收稿日期] 2020-05-26; **[修回日期]** 2020-12-19

[基金项目] 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) (22170124); 河南省医学科技攻关计划 (SBGJ2018038)

[作者简介] 田晴, 硕士, E-mail: 635448763@qq.com

[通信作者] 陈栋, 教授, 博士, E-mail: fccchend@zzu.edu.cn

postnatal day 19, only a few fragments of HERS were found on the root surface, and the root development was immature. Moreover, the expression intensity of PCNA in the gene knockout mouse was decreased. **Conclusion** The Vps4b gene mutation may change the CK14 and PCNA expressions, leading to abnormal root development.

[Key words] Vps4b gene; Hertwig's epithelial root sheath; cytokeratin 14; proliferating cell nuclear antigen; gene knockout

遗传性牙本质发育异常是牙本质矿化及结构异常的一类常染色体显性遗传病。不同于以往的Shield关于牙本质发育异常的分类^[1],目前学者^[2]更倾向将其分为牙本质发育不全(dentinogenesis imperfecta, DGI)和根部牙本质发育不良(radicular dentin dysplasia)即牙本质发育不良I型(dentin dysplasia-I, DD-I)两类。DD-I是一种牙冠形态大致正常而牙根畸形导致青少年时期牙齿自发脱落的常染色体显性遗传病,该病具有遗传异质性^[3]。目前已报道的致病基因有SMOC2、SSUH2和VPS4B^[4-6]。本课题小组在豫北地区发现一个致病基因为VPS4B的DD-I家系^[6]。

在牙冠即将发育完成时,牙根开始形成。此时在颈环处由内外釉上皮细胞增生形成不含星网状层和中间层细胞的双层上皮结构,即上皮根鞘(Hertwig's epithelial root sheath, HERS)^[7]。HERS是牙根发育的启动中心,在牙根发育中发挥重要作用^[8-9]。其可诱导内侧的牙乳头细胞分化为牙本质细胞,生成根部牙本质。根部牙本质形成时,HERS发生断裂,外侧的牙囊细胞与牙本质接触,分化成牙骨质细胞,进而形成根部牙骨质。细胞角蛋白14(cytokeratin 14, CK14)是一种具有很强特异性的牙源性上皮标记蛋白^[9],常用来标记釉质上皮。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在DNA复制中必不可少,可表达于细胞周期的各个阶段,通过监测PCNA细胞核阳性表达的高低可观察细胞增殖活性强弱^[10]。VPS4B是一种多功能蛋白,可降解溶酶体、转运胞内蛋白和病毒出芽。HERS的形态、增殖及凋亡对牙根的发育至关重要。本研究拟通过免疫组织化学染色技术来检测正常小鼠和Vps4b基因敲除小鼠磨牙牙胚中的HERS形态以及细胞内CK14和PCNA的表达情况,进一步探讨Vps4b基因突变对牙根发育异常的可能影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂、设备

野生型C57BL/6J体系小鼠(济南朋悦实验动

物繁育有限公司),Vps4b基因敲除鼠(南京大学-南京生物医药研究院)。KAPA快速DNA提取试剂盒(北京普凯瑞生物科技有限公司),Taq聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增试剂盒、寡核苷酸引物(北京鼎国昌盛生物技术有限公司),PCR扩增仪(Eppendorf公司,德国),CK14抗体和PCNA抗体(北京博奥森生物技术有限公司),光学显微镜(Olympus公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 标本的制备 在同一时刻将基因敲除雄鼠与正常雌鼠以1:2的比例交配,新生小鼠出生当天中午计作出生后(postnatal, P)0.5 d,用无菌剪刀剪下2~3 mm出生后新生小鼠鼠尾,置于1.5 mL离心管,待进行基因型鉴定,剪取时注意避免交叉污染。断颈法处死出生后5 d(P5 d)、9 d(P9 d)、11 d(P11 d)、15 d(P15 d)以及19 d(P19 d)的新生鼠,使用眼科剪和眼科镊分离双侧下颌骨组织,4%多聚甲醛溶液固定24 h,10%乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)溶液脱钙3~6 d,梯度乙醇脱水,浸蜡,包埋,制备5 μm的连续切片。

1.2.2 基因型的鉴定 剪碎新生小鼠尾巴,置于1.5 mL离心管内,提取小鼠基因组DNA(genomic DNA, gDNA)。采用25 μL PCR反应体系,根据使用说明,待测gDNA 0.5 μL, Taq DNA聚合酶0.5 μL,引物1 μL, dNTP 0.5 μL, 10×Taq缓冲液2.5 μL, ddH₂O 20 μL混匀后离心数秒,放入PCR仪扩增。设计2种Vps4b gDNA基因型鉴定引物,见表1。PCR反应程序:Vps4b-1进行94 °C预变性5 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环35次, 72 °C延伸10 min, 4 °C保存; Vps4b-2进行95 °C预变性5 min, 95 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环20次, 然后95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环20次, 72 °C延伸10 min, 16 °C保存。取扩增产物5 μL,加入琼脂糖凝胶孔内,观察电泳结果。

1.2.3 免疫组织化学染色 取P5 d、P9 d、P11 d、P15 d、P19 d新生鼠的双侧下颌骨组织,通过苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色确定不

同时期小鼠下颌第一磨牙牙胚的切片，再使用免疫组织化学法染色。切片脱蜡，乙醇溶液梯度复水，微波炉中蒸煮pH 6.0的柠檬酸抗原修复液至沸腾后放入切片90 s，PBS冲洗5 min×3次；在切片组织上避光滴加3% H₂O₂，静置30 min，盖上盖子，PBS冲洗5 min×3次；滴加适量10%兔血清，室温封闭1 h；分别滴加1:100稀释的CK，1:200稀释的PCNA，封盒，4℃冰箱内过夜保存；PBS冲洗5 min×2次，滴加二抗，37℃湿盒内静置30 min；PBS冲洗5 min×2次，滴加辣根过氧化物酶，37℃下放置30 min；滴加DAB显色，苏木素复染，乙醇溶液脱水，二甲苯溶液（I）、二甲苯溶液（II）中透明，滴加中性树胶封固，观察切片并拍照。

1.2.4 免疫组织化学结果判定 在100倍下观察染色情况，颜色明显高于背景的记为强阳性，高于背景的记为阳性，略高于背景的记为弱阳性，CK14阳性物质位于细胞质内，PCNA阳性物质位于细胞核内。CK14胞质棕红色为阳性表达，蓝色

为阴性表达；PCNA胞核棕褐色或棕黄色为阳性表达，蓝色为阴性表达。

表 1 Vps4b gDNA基因型鉴定的PCR引物

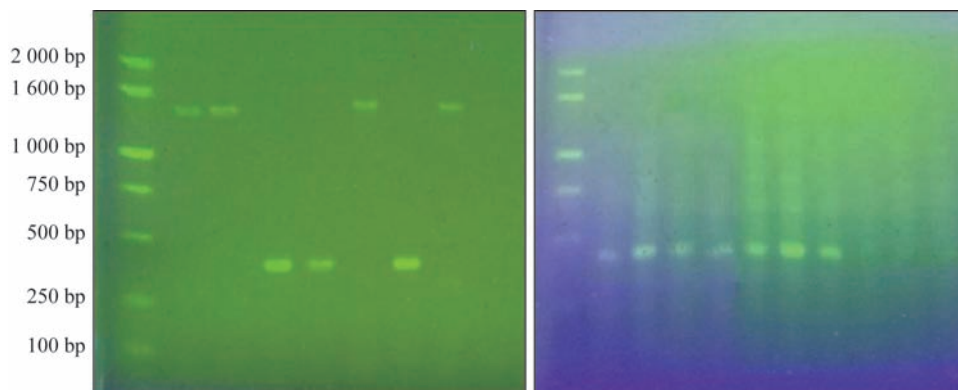
Tab 1 PCR primers for Vps4b gDNA genotype identification

基因型	引物序列 (5'-3')
Vps4b-1	F1: TGCTTTAGGCAAAGCAGCAC
	R1: GCTGAAACTGGAGGGTTAGG
Vps4b-2	F2: TGCTTTAGGCAAAGCAGCAC
	R2: TTTCTGTGTGAGGGAGGCAA

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定结果

PCR结果显示，F1/R1作为引物，扩增出2种条带，一种1383 bp条带，一种384 bp条带（图1左）；F2/R2作为引物，扩增出一种425 bp条带（图1右）。这表明，新生小鼠中存在杂合型和野生型，不存在纯合突变型。



左：以F1/R1为引物扩增出2种条带；右：以F2/R2为引物扩增出一种条带。

图 1 小鼠Vps4b gDNA扩增

Fig 1 Amplification of Vps4b gDNA

2.2 不同发育时期HERS形态

CK14抗体免疫组织化学可以观察到：正常小鼠P5 d开始形成HERS，并向未来根尖方向生长；P9 d开始出现根分叉结构，此时HERS结构连续，外层为矩形细胞，内层为立方状细胞；到P11 d，一小部分HERS结构开始发生断裂，HERS细胞在牙根面呈簇状聚集；在P15 d，HERS结构断裂，仅末端部分完整，此时牙根的1/3已形成；P19 d牙根基本达到生理性发育的长度，HERS末端结构仍完整，断裂HERS细胞紧贴牙根面（图2上）。Vps4b基因敲除小鼠同样于P5 d形成HERS结构；然而在P9 d，HERS就开始断裂；在P11 d到P15 d根尖HERS结构完整，颈部呈不规则细胞簇；在

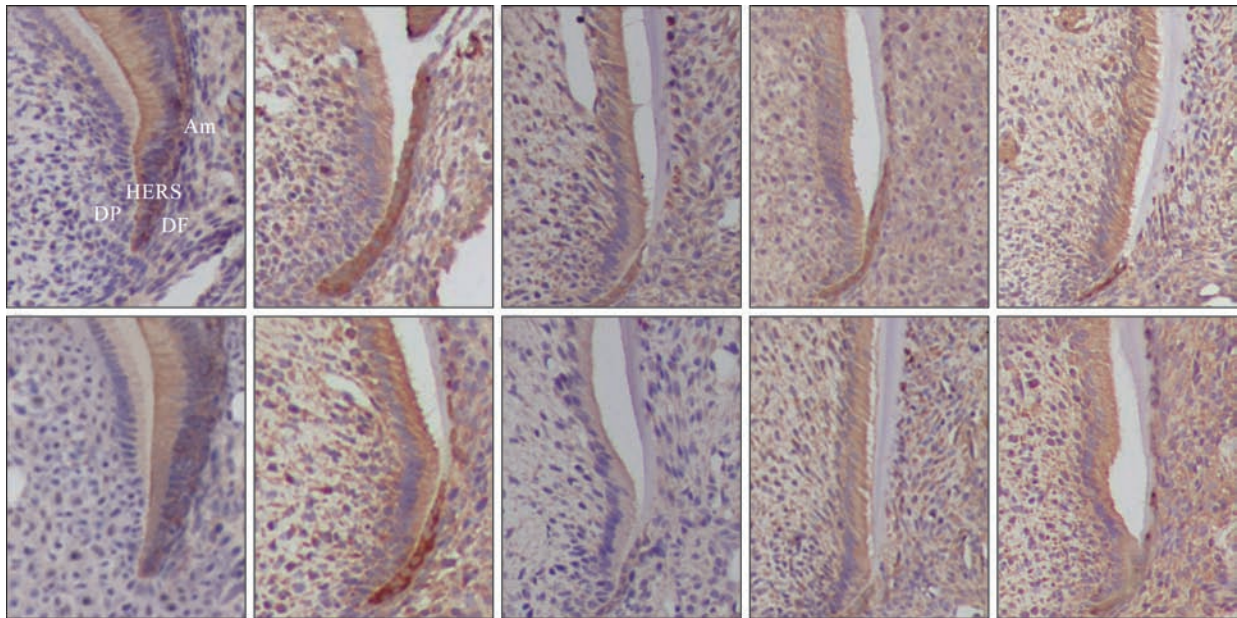
P19 d牙根表面仅存少量HERS碎片，且根尖的发育不成熟（图2下）。

2.3 PCNA的表达分布

PCNA免疫组织化学结果见图3。P5 d，PCNA在正常小鼠颈部冠边缘附近的成釉细胞和HERS细胞中强阳性表达，牙囊细胞和牙乳头细胞中阳性表达；在Vps4b基因敲除小鼠成釉细胞、HERS细胞、牙囊细胞及牙乳头细胞阳性表达，但强度降低。P9 d，PCNA在正常小鼠牙乳头细胞中呈强阳性表达，成釉细胞、HERS细胞和牙囊细胞中阳性表达；在Vps4b基因敲除小鼠牙乳头细胞呈阳性表达，成釉细胞、HERS细胞弱阳性表达。P11 d，PCNA在正常小鼠牙乳头细胞呈阳性表达，

成釉细胞、HERS细胞和牙囊细胞中弱阳性表达；在Vps4b基因敲除小鼠牙根表面HERS细胞中弱阳性表达，在牙乳头细胞中呈弱阳性表达。P15 d，PCNA在正常小鼠牙乳头细胞阳性表达，牙囊细胞弱阳性表达，牙根表面HERS细胞中弱阳性表达；在Vps4b基因敲除小鼠牙囊细胞及牙乳头细胞阳性

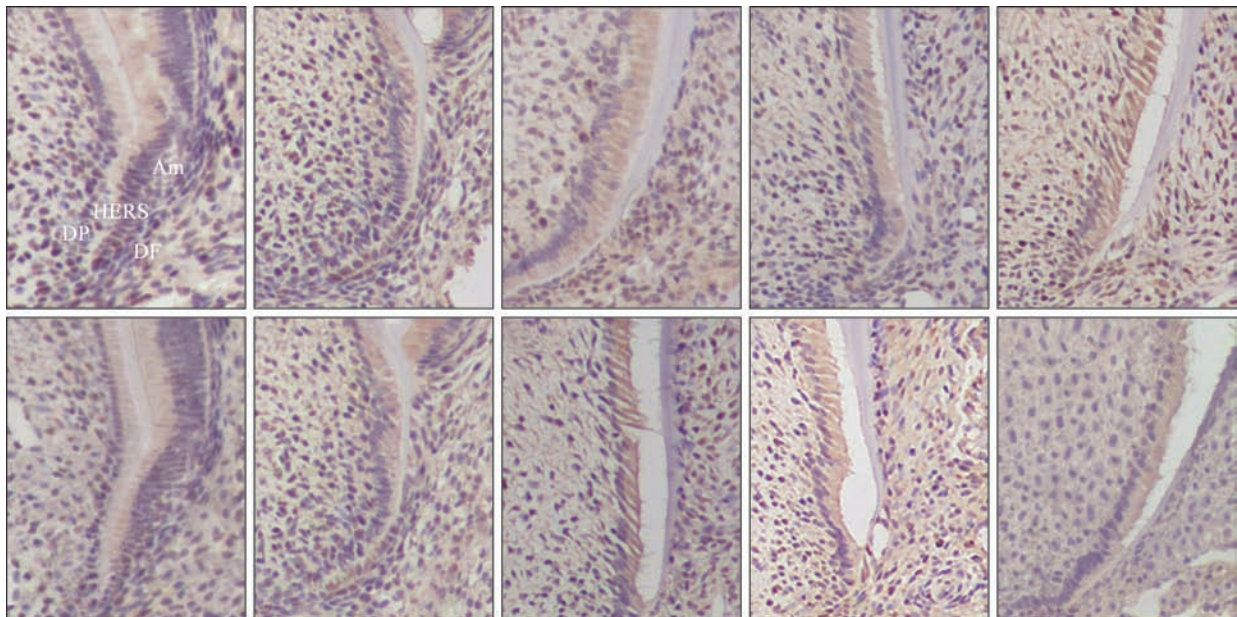
表达，HERS细胞中弱阳性表达。P19 d，PCNA仅在正常小鼠牙根末端HERS细胞中阳性表达、牙乳头细胞和牙囊细胞中弱阳性表达；在Vps4b基因敲除小鼠HERS细胞弱阳性表达，牙囊细胞及牙乳头细胞中无表达。



上：正常小鼠；下：Vps4b基因敲除小鼠。从左到右依次为P5 d、P9 d、P11 d、P15 d、P19 d。Am：成釉细胞；DP：牙乳头；DF：牙囊。

图 2 CK14免疫组织化学结果 ×100

Fig 2 Immunohistochemical results of cytokeratin 14 ×100



上：正常小鼠；下：Vps4b基因敲除小鼠。从左到右依次为P5 d、P9 d、P11 d、P15 d、P19 d。Am：成釉细胞；DP：牙乳头；DF：牙囊。

图 3 PCNA免疫组织化学结果 ×100

Fig 3 Immunohistochemical results of PCNA ×100

3 讨论

条件性基因敲除技术是研究基因的一种重要方法。本研究中的 Vps4b 基因敲除小鼠是通过 CRISPR-Cas9 技术获得的^[11]，均为杂合子，理论上子代小鼠有 Vps4b^{+/+}、Vps4b^{+/-}、Vps4b^{-/-} 3 种类型。本研究中 PCR 扩增显示子代小鼠中不存在 Vps4b^{-/-} 纯合子，说明 Vps4b 基因在胚胎发育过程中起重要作用，且已有研究^[12]表明 Vps4b 基因敲除小鼠纯合突变在胚胎早期发育阶段致死。VPS4B 基因通过 Wnt-β-catenin 信号通路调节人牙髓干细胞 (human dental pulp stem cells, hDPSCs) 的增殖、迁移和向成牙本质细胞分化，在 hDPSCs 向成牙本质细胞分化过程中存在高度表达的 VPS4B 蛋白。这表明 Vps4b 基因在牙齿发育中发挥重要作用。

正常牙根的发育与 HERS 密切相关，首先需要形成完整的 HERS，继而 HERS 在特定的时期断裂，同时 HERS 细胞发生凋亡。本实验中正常小鼠 P11 d HERS 开始发生断裂，而 Vps4b 基因敲除小鼠 HERS 在 P9 d 就开始断裂，最终牙根发育不完整，提示 Vps4b 基因对牙根的发育有一定的影响。本研究利用 PCNA 监测 HERS 细胞及其周围细胞的增殖活性，发现 P5 d 到 P19 d，PCNA 在 HERS 末端始终阳性表达，表明 HERS 细胞增殖在牙根生长发育中的潜在重要作用。与正常小鼠相比，Vps4b 基因敲除小鼠 P9 d 时 HERS 结构就开始断裂，PCNA 在 HERS 细胞、牙乳头细胞中的表达强度显著降低，P19 d 时 PCNA 仅在 HERS 细胞中弱阳性表达，因此本研究推测 Vps4b 基因可能通过降低 HERS 细胞及牙乳头细胞的增殖活性，影响 HERS 断裂的时间以及成牙本质细胞的形成，进而导致牙本质形成异常。

本研究通过免疫组织化学方法，观察到不同时期 HERS 的形态变化以及 PCNA 在 Vps4b 基因敲除小鼠 HERS 中的表达改变，进一步推测 Vps4b 基因突变导致 HERS 细胞增殖发生改变，最终引起牙根发育异常。VPS4B 基因可通过 MAPK 通路调控细胞的数量变化^[13]，本研究猜测 Vps4b 基因可能也通过 MAPK 通路调控 HERS 细胞的增殖凋亡。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

[1] Hart PS, Hart TC. Disorders of human dentin[J]. Cells

Tissues Organs, 2007, 186(1): 70-77.

- [2] de La Dure-Molla M, Philippe Fournier B, Berdal A. Isolated dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia: revision of the classification[J]. Eur J Hum Genet, 2015, 23(4): 445-451.
- [3] Chen D, Li X, Lu F, et al. Dentin dysplasia type I — A dental disease with genetic heterogeneity[J]. Oral Dis, 2019, 25(2): 439-446.
- [4] Bloch-Zupan A, Jamet X, Etard C, et al. Homozygosity mapping and candidate prioritization identify mutations, missed by whole-exome sequencing, in SMOC2, causing major dental developmental defects[J]. Am J Hum Genet, 2011, 89(6): 773-781.
- [5] Xiong F, Ji ZS, Liu YH, et al. Mutation in SSUH2 causes autosomal-dominant dentin dysplasia type I [J]. Hum Mutat, 2017, 38(1): 95-104.
- [6] Yang Q, Chen D, Xiong F, et al. A splicing mutation in VPS4B causes dentin dysplasia I [J]. J Med Genet, 2016, 53(9): 624-633.
- [7] Yamamoto T, Yamada T, Yamamoto T, et al. Hertwig's epithelial root sheath fate during initial cellular cementogenesis in rat molars[J]. Acta Histochem Cytochem, 2015, 48(3): 95-101.
- [8] Jung HS, Lee DS, Lee JH, et al. Directing the differentiation of human dental follicle cells into cementoblasts and/or osteoblasts by a combination of HERS and pulp cells[J]. J Mol Histol, 2011, 42(3): 227-235.
- [9] Huang XF, Bringas P Jr, Slavkin HC, et al. Fate of HERS during tooth root development[J]. Dev Biol, 2009, 334(1): 22-30.
- [10] Xu J, Morris GF. P53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(1): 12-20.
- [11] Xu M, Xu HZ, Chen J, et al. Generation of conditional Acvr11 knockout mice by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting[J]. Mol Cell Probes, 2018, 37: 32-38.
- [12] Hu AQ, Lu T, Chen DN, et al. Vps4b heterozygous mice do not develop tooth defects that replicate human dentin dysplasia I[J]. BMC Genet, 2019, 20(1): 7.
- [13] Xu LB, Zhai LL, Ge QT, et al. Vacuolar protein sorting 4B (VPS4B) regulates apoptosis of chondrocytes via p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) in osteoarthritis[J]. Inflammation, 2017, 40(6): 1924-1932.

(本文编辑 李彩)