

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.24.001

## 含蛋白结构域 A 的纤维连接蛋白在根尖囊肿中的表达及作用机制\*

陈柚杉<sup>1</sup>,王海丞<sup>2△</sup>

1. 同济大学附属口腔医院检验科,上海 200072;2. 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 探讨在根尖囊肿中含蛋白结构域 A 的纤维连接蛋白(EDA+FN)与成纤维细胞破骨作用之间的关系。**方法** 采用免疫组织化学法对根尖囊肿标本进行染色,分析 EDA+FN 染色强度与根尖囊肿颌骨病变范围的关系。分别培养从根尖囊肿标本(研究组,20 例)和正常颌骨标本(对照组,6 例)分离出的成纤维细胞,并制作条件培养基,诱导破骨细胞形成。用 CRISPR/Cas9 系统敲除成纤维细胞的蛋白结构域 A(EDA)外显子,比较 EDA 敲除组与非 EDA 敲除组破骨相关因子 mRNA 表达水平。**结果** EDA+FN 的染色强度与根尖囊肿颌骨病变范围呈正相关( $r=0.594, P=0.006$ )。研究组 EDA+FN mRNA 的表达水平明显高于对照组( $P<0.05$ )。研究组成纤维细胞诱导的破骨细胞数与 EDA+FN mRNA 表达水平呈正相关( $r=0.817, P<0.001$ )。EDA 敲除组成纤维细胞诱导的破骨细胞数明显少于非 EDA 敲除组( $P<0.05$ )。EDA 敲除组成纤维细胞中白细胞介素-6、巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、血管内皮生长因子 A、核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体(RANKL)和 RANKL/骨保护素的 mRNA 表达水平均低于非 EDA 敲除组( $P<0.05$ )。**结论** 根尖囊肿成纤维细胞能分泌 EDA+FN,促进骨破坏,而敲除 EDA 外显子可抑制骨破坏。

**关键词:**蛋白结构域 A; 纤维连接蛋白; 破骨细胞; 根尖囊肿

中图法分类号:R781.3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)24-3553-04

**Expression and mechanism of fibronectin containing protein domain A in radicular cyst\***CHEN Youshan<sup>1</sup>, WANG Haicheng<sup>2△</sup>

1. Department of Clinical Laboratory, Tongji University Affiliated Stomatological Hospital, Shanghai 200072, China; 2. College of Stomatology Affiliated to Tongji University/Shanghai Engineering Research Center of Tooth Restoration and Regeneration, Shanghai 200072, China

**Abstract: Objective** To explore the relationship between fibronectin containing protein domain A (EDA+FN) and osteoclasts of fibroblast in radicular cyst. **Methods** Immunohistochemistry was used to stain the radicular cyst specimens, and the relationship between the intensity of EDA+FN staining and the range of jaw lesions in radicular cyst was analyzed. Cultured fibroblasts isolated from radicular cyst specimens (study group, 20 cases) and normal jaw specimens (control group, 6 cases), and conditioned medium was prepared to induce osteoclast generation. The EDA exons of fibroblasts were knocked out by the CRISPR/Cas9 system, and the mRNA expression levels of osteoclast-related factors were compared between EDA knockout group and non-EDA knockout group. **Results** There was a positive correlation between the staining intensity of EDA+FN and the range of jaw lesions in radicular cyst ( $r=0.594, P=0.006$ ). The expression level of EDA+FN mRNA in the study group was significantly higher than that in the control group ( $P<0.05$ ). The number of osteoclasts induced by fibroblasts in the study group was positively correlated with the expression level of EDA+FN mRNA ( $r=0.817, P<0.001$ ). The number of osteoclasts induced by fibroblasts in the EDA knockout group was significantly lower than that in the non-EDA knockout group ( $P<0.05$ ). The mRNA expression levels of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, tumor necrosis factor- $\alpha$ , vascular endothelial growth factor A, nuclear factor  $\kappa$ B receptor activator ligand (RANKL) and RANKL/osteoprotegerin in fibroblasts of EDA knockout group were lower than those in non-EDA knockout group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The fibroblasts of radicular cyst can secrete EDA+FN and promote bone destruction, however, EDA exons knockout can inhibit bone destruction.

**Key words:** protein domain A; fibronectin; osteoclast; radicular cyst

\* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81600836)。

作者简介:陈柚杉,女,技师,主要从事临床分子生物检验研究。△ 通信作者, E-mail: haichengwang@sina.com。

在使颌骨变形的良性病变中,牙源性囊肿约占 18.5%,其中 52.0%~68.0%为根尖囊肿<sup>[1]</sup>。根尖囊肿的囊壁主要由细胞外基质(ECM)、细胞因子和成纤维细胞的代谢产物组成<sup>[2-3]</sup>,其通过调节破骨细胞的分化或活化,创造有利于破骨细胞生成的微环境,诱导破骨细胞形成,导致骨破坏,从而参与病变的发展<sup>[4-5]</sup>。纤维连接蛋白(FN)是 ECM 的主要成分,广泛分布于结缔组织中,可通过将 FN 基因中的蛋白结构域 A(EDA)、蛋白结构域 B(EDB)和 CS1 结构域交替剪接产生不同的 FN 亚型,包括含 EDA 的 FA(EDA+FN)、含 EDB 的 FN(EDB+FN)和含 CS1 的 FN(CS1-FN)<sup>[6]</sup>。在慢性炎症反应浸润下,根尖囊肿的基质可能形成一种微环境,激活成纤维细胞产生不同的 FN 亚型。不同的 FN 亚型可参与各种疾病的细胞增殖、转移或局部浸润,从而影响疾病的发展<sup>[7-8]</sup>。有研究表明,EDA+FN、EDB+FN 和 CS1-FN 可能与分泌破骨相关因子的成纤维细胞相互作用,从而影响破骨细胞的形成<sup>[4,9]</sup>。本文在研究不同 FN 亚型与根尖囊肿颌骨病变范围关系的基础上,通过比较不同条件下体外诱导破骨细胞的数量和破骨细胞相关因子的微小 RNA(mRNA)表达水平,探讨了 EDA+FN 与根尖囊肿骨破坏间的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2016—2017 年同济大学附属口腔医院口腔颌面外科手术切除的根尖囊肿标本 20 例作为研究组,6 例接受正颌手术患者的正常颌骨标本作为对照组。所有研究对象均签署知情同意书,本研究经医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学法染色** 将研究组 20 例根尖囊肿标本经 40%甲醛固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片;4℃下用 IST-9、BC-1 和 P1F11 抗体染色过夜(IST-9、BC-1 和 P1F11 分别检测 EDA+FN、EDB+FN、CS1-FN);采用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照,然后加生物素二抗(1:500),37℃孵育 30 min;采用二氨基联苯胺染色。染色强度用积分光密度与染色面积之比表示。

**1.2.2 细胞培养** 从研究组根尖囊肿标本中分离出成纤维细胞,并在 α 修饰的 Eagle 培养基(α-MEM)中培养;对照组 6 例正常颌骨标本处理步骤与研究组相同;鼠破骨细胞前体细胞系 Raw264.7 也在 α-MEM 中培养。α-MEM 中加入 10% 胎牛血清(FBS)、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素;培养条件:37℃、95%湿度、5%CO<sub>2</sub>。

**1.2.3 体外诱导破骨细胞形成** 上述研究组与对照组分离的成纤维细胞分别在 100 mm 培养皿中生长至 70%~80%融合时,采用无血清 α-MEM 置换培养基。培养 7 d 后,收集上清液并离心(550×g,10 min),将 50%上清液、40%α-MEM、10%FBS 和 12 ng/μL 重组鼠核因子-κB 受体活化因子配体(RANKL)混合,以

制备用于在体外诱导破骨细胞的培养培养基。将鼠破骨细胞前体细胞系 Raw264.7 以 1 000 个/孔接种于 24 孔板中,加入上述条件培养基进行培养,2 d 更换 1 次培养基,持续培养 10 d。用 4%多聚甲醛固定细胞,用抗酒石酸酸性磷酸酶(Trap)试剂盒进行细胞染色。Trap 染色阳性的多核(≥3 个核)细胞计为破骨细胞。

**1.2.4 敲除 EDA 外显子** 从研究组 20 例标本中选取 6 例可提供足够细胞的根尖囊肿标本,用于分离成纤维细胞,当成纤维细胞生长至 60%~70%融合时,将培养基替换为无血清 α-MEM,孵育 6 h;用脂质体 2000 将 pX330 载体 CRISPR/Cas9 质粒转染到细胞中敲除 EDA 外显子;48 h 后,收集存活的细胞制备条件培养基<sup>[10]</sup>,使用该条件培养基在体外诱导破骨细胞,作为 EDA 敲除组。另从研究组中选取 6 例根尖囊肿标本作为非 EDA 敲除组,保留 EDA 外显子,其余处理步骤与 EDA 敲除组相同。

**1.2.5 RNA 提取和实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测** 各组提取 RNA,将 Trizol 试剂纯化的 2 μg RNA 用反转录试剂盒合成 cDNA;吸取 20 μL cDNA,用 RT-qPCR 检测各组成纤维细胞中破骨相关因子[肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、白细胞介素-17(IL-17)、环氧酶-2(COX-2)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、白细胞介素-1α(IL-1α)、RANKL、骨骼保护素(OPG)、RANKL/OPG]的 mRNA 表达水平;检测研究组与对照组 EDA+FN、EDB+FN、CS1-FN 的 mRNA 表达水平。反应条件:孵育 95℃ 10 min,退火/扩增 95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。

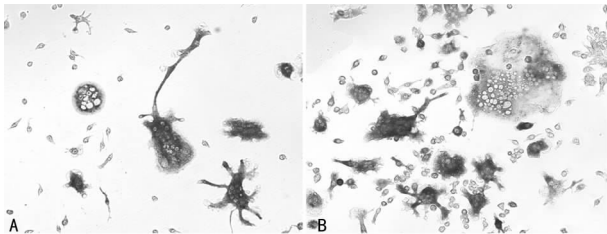
**1.3 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ<sup>2</sup> 检验;符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验;不符合正态分布的计量资料以 *M*(*P*<sub>25</sub>, *P*<sub>75</sub>) 表示,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验;相关性分析采用 Spearman 相关或 Pearson 相关。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 EDA+FN 染色强度与根尖囊肿颌骨病变范围的关系** EDA+FN 明显比 EDB+FN 和 CS1-FN 的染色面积更大、颜色更深。以 EDA+FN、EDB+FN 和 CS1-FN 的染色强度中值为界分为高、低染色强度,分析不同 FN 亚型染色强度与根尖囊肿颌骨病变范围的关系。结果显示,EDA+FN 高染色强度患者病变范围>150 mm<sup>2</sup> 的人数比例高于低染色强度患者(*P*<0.05);进一步行相关性分析发现,EDA+FN 的染色强度与病变范围呈正相关(*r*=0.594, *P*=0.006);而 EDB+FN 与 CS1-FN 不同染色强度患者病变范围>150 mm<sup>2</sup> 的人数比例比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05)。见表 1。

**2.2 EDA+FN 促进破骨细胞的形成和破骨相关因**

子的表达 分析研究组和对照组成纤维细胞中不同 FN 亚型的 mRNA 表达水平,所有亚型中以 EDA+FN mRNA 表达水平最高,且研究组 EDA+FN mRNA 表达水平(0.389±0.175)明显高于对照组(0.183±0.138),差异有统计学意义( $P<0.05$ )。相关性分析结果显示,研究组成纤维细胞诱导的破骨细胞数与 EDA+FN mRNA 表达水平呈正相关( $r=0.817, P<0.001$ )。研究组成纤维细胞诱导的破骨细胞数为(12.075±7.500)个,明显高于对照组的(5.290±2.170)个( $P<0.05$ ),见图 1。研究组成纤维细胞中 COX-2、IL-6、IL-17 和 RANKL/OPG 的 mRNA 表达水平明显高于对照组,IL-1 $\alpha$  的 mRNA 表达水平明显低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。



注:A 为对照组体外诱导的破骨细胞;B 为研究组体外诱导的破骨细胞。

图 1 研究组与对照组体外诱导的破骨细胞( $\times 200$ )

2.3 EDA 敲除组与非 EDA 敲除组成纤维细胞中破骨相关因子 mRNA 表达水平比较 EDA 敲除组成纤维细胞诱导的破骨细胞数为(6.083±2.217)个,明显少于非 EDA 敲除组的(9.292±1.933)个( $P<0.05$ )。EDA 敲除组成纤维细胞中 IL-6、M-CSF、TNF- $\alpha$ 、VEGFA、RANKL 和 RANKL/OPG 的 mRNA 表达水平均低于非 EDA 敲除组( $P<0.05$ )。见表 3。

表 1 不同 FN 亚型染色强度与根尖囊肿颌骨病变范围的关系[n(%)]

染色强度	病变范围		$\chi^2$	P
	$\leq 150 \text{ mm}^2$	$> 150 \text{ mm}^2$		
EDA+FN				
低染色强度	8(80)	2(20)	7.2	0.023
高染色强度	2(20)	8(80)		
EDB+FN				
低染色强度	7(70)	3(30)	3.2	0.070
高染色强度	3(30)	7(70)		
CS1-FN				
低染色强度	6(60)	4(40)	3.8	0.056
高染色强度	4(40)	6(60)		

表 2 研究组、对照组成纤维细胞中破骨相关因子的 mRNA 表达水平比较

组别	n	COX-2( $\bar{x}\pm s$ )	IL-6( $\bar{x}\pm s$ )	TNF- $\alpha$ ( $\bar{x}\pm s$ )	RANKL( $\bar{x}\pm s$ )	RANKL/OPG( $\bar{x}\pm s$ )
研究组	20	0.035 15±0.022 75	0.004 55±0.002 21	0.007 39±0.003 91	0.000 10±0.000 04	0.021 25±0.013 39
对照组	6	0.008 56±0.005 16	0.002 38±0.001 61	0.008 46±0.003 69	0.000 08±0.000 03	0.006 82±0.004 74
t/Z		2.803	2.221	0.595	1.127	2.621
P		0.010	0.036	0.558	0.271	0.015

组别	n	IL-17( $\bar{x}\pm s$ )	VEGFA( $\bar{x}\pm s$ )	OPG[M( $P_{25}, P_{75}$ )]	M-CSF[M( $P_{25}, P_{75}$ )]	IL-1 $\alpha$ [M( $P_{25}, P_{75}$ )]
研究组	20	0.014 53±0.005 00	0.007 71±0.002 81	0.003 85(0.001 09, 0.014 24)	0.005 96(0.003 88, 0.008 06)	0.003 68(0.002 07, 0.003 69)
对照组	6	0.007 64±0.006 60	0.006 73±0.003 64	0.015 01(0.008 02, 0.024 47)	0.000 15(0.000 04, 0.020 54)	0.011 16(0.007 44, 0.025 60)
t/Z		2.755	0.701	1.522	1.096	2.721
P		0.011	0.490	0.128	0.273	0.007

表 3 EDA 敲除组与非 EDA 敲除组成纤维细胞中破骨相关因子 mRNA 表达水平比较

组别	n	COX-2( $\bar{x}\pm s$ )	IL-6( $\bar{x}\pm s$ )	M-CSF( $\bar{x}\pm s$ )	TNF- $\alpha$ ( $\bar{x}\pm s$ )	VEGFA( $\bar{x}\pm s$ )
非 EDA 敲除组	6	0.027 76±0.014 27	0.003 96±0.002 00	0.004 03±0.001 54	0.006 08±0.002 62	0.007 97±0.005 03
EDA 敲除组	6	0.014 62±0.007 47	0.001 78±0.000 88	0.002 17±0.001 02	0.002 14±0.000 70	0.002 51±0.001 26
t/Z		1.640	2.444	2.467	3.559	2.579
P		0.132	0.035	0.033	0.005	0.027

组别	n	RANKL( $\bar{x}\pm s$ )	RANKL/OPG( $\bar{x}\pm s$ )	OPG[M( $P_{25}, P_{75}$ )]	IL-17[M( $P_{25}, P_{75}$ )]	IL-1 $\alpha$ [M( $P_{25}, P_{75}$ )]
非 EDA 敲除组	6	0.000 11±0.000 04	0.022 03±0.010 67	0.006 66(0.001 69, 0.011 10)	0.005 87(0.003 31, 0.023 64)	0.006 34(0.001 53, 0.016 15)
EDA 敲除组	6	0.000 06±0.000 02	0.010 59±0.005 22	0.008 12(0.000 71, 0.011 43)	0.012 75(0.006 50, 0.023 01)	0.001 18(0.000 13, 0.019 44)
t/Z		2.739	2.359	0.480	0.641	0.961
P		0.021	0.040	0.631	0.522	0.337

### 3 讨 论

根尖囊肿是慢性根尖周炎的一种,会破坏患者牙齿根尖周围的牙槽骨<sup>[11-12]</sup>,且在此破坏过程中,成纤维细胞的增殖或囊肿基质中的炎症环境促进了 FN 基因的可变剪接,产生 EDA+FN、EDB+FN 和 CS1-FN 亚型<sup>[13-15]</sup>,这些亚型可刺激成纤维细胞产生破骨相关因子,诱导破骨细胞生成<sup>[4,9]</sup>。

在本研究中,采用免疫组织化学法对根尖囊肿标本进行染色,比较了不同亚型的染色强度,结果显示,EDA+FN 明显比 EDB+FN 和 CS1-FN 的染色面积更大、颜色更深,且 EDA+FN 的染色强度与颌骨病变病变范围呈正相关,提示 EDA+FN 可能是造成骨破坏的主要亚型。本研究中,研究组破骨相关因子 COX-2、IL-6、IL-17 和 RANKL/OPG 的 mRNA 表达水平高于对照组,提示上述破骨相关因子在根尖囊肿骨破坏中发挥重要作用。但研究组 IL-1 $\alpha$  的 mRNA 表达水平低于对照组,考虑与纳入样本量较少有关。既往研究表明,牙源性囊肿纤维囊中的成纤维细胞有利于破骨细胞形成,在颌骨骨破坏中起重要作用<sup>[2]</sup>。在本研究中,分别用根尖囊肿和正常颌骨的成纤维细胞体外诱导破骨细胞,根尖囊肿成纤维细胞诱导的破骨细胞明显多于正常颌骨成纤维细胞诱导的破骨细胞,这表明根尖囊肿成纤维细胞可促进破骨细胞的形成,与上述研究结果一致。相关性分析结果显示,研究组成纤维细胞诱导的破骨细胞数与 EDA+FN mRNA 表达水平呈正相关( $r=0.817, P<0.001$ ),提示 EDA+FN 可能是成纤维细胞中发挥促进破骨细胞形成的主要亚型。进一步使用 CRISPR/Cas9 系统敲除根尖囊肿中成纤维细胞的 EDA 外显子,发现敲除 EDA 外显子后的成纤维细胞所诱导的破骨细胞明显减少,且根尖囊肿成纤维细胞中 TNF- $\alpha$ 、RANKL、RANKL/OPG、IL-6、M-CSF 和 VEGFA 的表达也被抑制,表明是 EDA+FN 中的 EDA 外显子在成纤维细胞分泌破骨相关因子中发挥了关键作用,并影响了破骨细胞的形成。根尖囊肿成纤维细胞能分泌 EDA+FN,EDA+FN 又作用于成纤维细胞,导致一系列破骨相关因子的高表达,从而刺激并促进破骨细胞的生成,造成骨破坏,提示 EDA 有可能成为抑制骨破坏的潜在靶点。

综上所述,根尖囊肿成纤维细胞能分泌 EDA+FN,促进骨破坏,而敲除 EDA 外显子可抑制骨破坏,为临床治疗提供了新的靶点。

### 参考文献

[1] IMRAN A, JAYANTHI P, TANVEER S, et al. Classification of odontogenic cysts and tumors-antecedents[J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2016, 20(2): 269-271.

[2] BERNARDI L, VISIOLI F, CAROLINA N, et al. Radicular cyst: an update of the biological factors related to lin-

ing epithelium[J]. J Endod, 2015, 41(12): 1951-1961.

[3] DE MORAES M, DE MATOS F R, DE SOUZA L B, et al. Immunoexpression of RANK, RANKL, OPG, VEGF, and vWF in radicular and dentigerous cysts[J]. J Oral Pathol Med, 2013, 42(6): 468-473.

[4] 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.

[5] WANG H C, JIANG W P, SIMA Z H, et al. Fibroblasts isolated from a keratocystic odontogenic tumor promote osteoclastogenesis in vitro via interaction with epithelial cells[J]. Oral Dis, 2015, 21(2): 170-177.

[6] KOUHSOLTANI M, HALIMI M, JABBARI G. Immunohistochemical evaluation of myofibroblast density in odontogenic cysts and tumors[J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2016, 10(1): 37-42.

[7] RAMOS G D O, BERNARDI L, LAUXEN I, et al. Fibronectin modulates cell adhesion and signaling to promote single cell migration of highly invasive oral squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151338.

[8] KAMARAJAN P, GARCIA-PARDO A, DSILVA N J, 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(1): 330-334.

[9] JONES M C, CASWELL P T, MORAN-JONES K, et al. VEGFR1 (Flt1) regulates Rab4 recycling to control fibronectin polymerization and endothelial vessel branching[J]. Traffic, 2009, 10(6): 754-766.

[10] LV W Q, WANG H C, PENG J, et al. Gene editing of the extra domain A positive fibronectin in various tumors, amplified the effects of CRISPR/Cas system on the inhibition of tumor progression[J]. Oncotarget, 2017, 8(62): 105020-105036.

[11] CELIA C G, SEMPERE F V, MIGUEL P D, et al. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2008, 12(8): 585-590.

[12] 任小华, 韩红娟, 吴浩, 等. 上中切牙根尖囊肿治疗后正畸牙移动的初步研究[J]. 实用医院临床杂志, 2018, 15(4): 83-85.

[13] HEIKINHEIMO K, MORGAN P R, HAPPONEN R P, et al. Distribution of extracellular matrix proteins in odontogenic tumours and developing teeth[J]. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1991, 61(2): 101-109.

[14] BOYLE D L, SHI Y, GAY S, et al. Regulation of CS1 fibronectin expression and function by IL-1 in endothelial cells[J]. Cell Immunol, 2000, 200(1): 1-7.

[15] 陈雅文, 王海丞, 董伟杰. 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[J]. 口腔医学研究, 2018, 34(9): 952-955.