

人特异性蛋白激酶-15 基因在增生牙龈组织中表达的研究

梅幼敏^{1,2}, 宦泓², 周艳², 谢海燕³, 张汝阳⁴, 徐艳^{1*}

(¹南京医科大学口腔医学院研究所, 江苏 南京 210029; ²南通市口腔医院牙周科, 江苏 南通 226001; ³江苏施尔美整形美容医院, 江苏 南京 210029; ⁴南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:检测细胞增殖相关基因人特异性蛋白激酶-15(specific protein kinase 15, NYD-SP15)基因在增生牙龈及正常牙龈组织中的表达,初步探讨该基因与牙龈增生发生的关系。方法:应用 RT-PCR 及免疫组化法检测 27 例正常牙龈组织(取自外伤冠折后行牙冠延长术中切除的牙龈组织)及 40 例牙龈增生患者(以增生表现为主的慢性牙龈炎 12 例、药物性牙龈增生 13 例、牙龈瘤 15 例)牙龈切除术中切除的增生牙龈组织标本中 NYD-SP15 mRNA 及蛋白的表达。结果:增生牙龈组织中 NYD-SP15 的 mRNA 水平显著高于正常牙龈组织($P < 0.05$)。免疫组化结果显示,在正常牙龈组织中该基因高表达于胞浆,在增生牙龈组织中高表达于胞核。结论:NYD-SP15 表达量异常以及定位差异在人牙龈增生发生发展过程中起到一定的作用,但该基因高表达与牙龈增生发生的相关机制尚待进一步研究。

[关键词] 人特异性蛋白激酶-15 基因; 牙龈增生; RT-PCR; 免疫组化

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)10-1372-04

The expression of human-specific protein kinase-15 in the hyperplastic gingival tissues

MEI You-min^{1,2}, HUAN Hong², ZHOU Yan², XIE Hai-yan³, ZHANG Ru-yang⁴, XU Yan^{1*}

(¹Institute of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Periodontics, Stomatology Hospital of Nantong, Nantong 226001; ³Jiangsu Shiermei Medical Plastic Surgery Hospital, Nanjing 210029; ⁴Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the human-specific protein kinase-15 (NYD-SP15) gene expression in normal gingival tissue and hyperplastic gingival tissues, observe the expression of NYD-SP15 protein in gingival tissues, and to explore the relationship of NYD-SP15 and gingival hyperplasia initially. **Methods:** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical method were applied to detect the expression of NYD-SP15 gene in gingival tissues of 27 cases of normal people and 40 cases of gingival hyperplasia patients. The normal gingival tissues were the excision of gingival tissue during crown lengthening surgery (the teeth were traumatic crown fractures), recorded as normal control group. The hyperplasia samples were the excision of gingival tissue during gingivectomy, recorded as hyperplasia group. The half of all specimens were removed and stored in nitrogen liquid immediately. The remaining half of the tissues with formalin, embedded in paraffin storage. Staining positive cells were counted under the microscope and classified by positive degree. The data of the experiment was analyzed by Stata 9.2 (Stata Corporation College Station, TX) software. **Results:** The expression of NYD-SP15 mRNA in tissues of hyperplasia group was significantly higher than that of control group ($P < 0.05$). The immunohistochemistry results showed that the NYD-SP15 protein was highly expression in the cytoplasm in normal gingival tissue. But, in the hyperplasia gingival tissues, the expression of NYD-SP15 protein was highly in the nucleus. **Conclusion:** The level of NYD-SP15 expression and location in the gingival tissues may be associated with the gingival hyperplasia. However, the relationship between them remains to be further studied.

[Key words] NYD-SP15; gingival hyperplasia; RT-PCR; immunohistochemistry

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(10): 1372-1375]

[基金项目] 国家自然科学基金(81170962);江苏省自然科学基金(BK2011763);江苏省高校优势学科建设工程资助
*通讯作者, E-mail: yanxu@njmu.edu.cn

人特异性蛋白激酶-15(specific protein kinase 15, NYD-SP15)基因是在对生精过程的研究中,通过基因芯片和定量 PCR 发现的一个与精子发生相关

的新基因,属于胞苷脱氨酶基因家族。已有研究发现该基因在细胞生长、增殖和凋亡中发挥着重要功能^[1-2]。本实验拟采用 RT-PCR 法和免疫组化法检测增生牙龈组织中该基因的表达变化,初步探讨该基因与牙龈增生发生的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 27 例正常牙龈组织(取自外伤冠折后行牙冠延长术中切除的牙龈组织)及 40 例牙龈增生患者(以增生表现为主的慢性牙龈炎 12 例、药物

性牙龈增生 13 例、牙龈瘤 15 例)牙龈切除术中切除的增生牙龈组织标本。标本均来源于南京医科大学附属口腔医院牙周科(所有患者均需先行牙周基础治疗控制炎症后再行手术切除牙龈)。正常牙龈组记为 N 组,增生牙龈组分别记为:A 组:以增生表现为主的慢性牙龈炎;B 组:药物性牙龈增生;C 组:牙龈瘤。各组病例的年龄、性别均无显著性差异,具有可比性(表 1)。所有标本取出后切取一半立即放入无 RNase 的 EP 管中并置液氮中保存待测,剩余一半组织用福尔马林固定,石蜡包埋储存。

表 1 4 组病例的基本特征

Table 1 The basic characteristics of the four groups of cases

变量		N 组(n = 27)	A 组(n = 12)	B 组(n = 13)	C 组(n = 15)	统计量	P 值
年龄(岁)	$\bar{x} \pm s$	31.63 ± 9.44	31.83 ± 13.68	35.69 ± 13.60	31.60 ± 10.84	F = 0.43	0.729 6
	M(Q ₂₅ ~Q ₇₅)	33.0(23.0~39.0)	29.5(18.5~46.5)	32.0(22.0~49.0)	31.0(24.0~38.0)		
	Min~Max	17~49	14~53	20~55	15~54		
性别[n(%)]	男	12(40.00)	5(16.67)	6(20.00)	7(23.33)	$\chi^2 = 0.08$	0.994 0
	女	15(40.54)	7(18.92)	7(18.92)	8(21.62)		

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR

①总 RNA 提取:从液氮中取出人牙龈组织标本,加液氮在匀浆器中研碎,用 TRIzol 试剂盒(Qiagen 公司,德国)抽提人牙龈组织总 RNA;②cDNA 的合成:RT 反应体系(TaKaRa Biotechnology 公司,大连)为:总 RNA 1 μ g,5 \times Prime Script™ Buffer 2 μ l, Prime Script™ RT Enzyme Mix I 0.5 μ l, Oligo dT Primer (50 μ mol/L) 0.5 μ l, Random 6 mers (100 μ mol/L) 0.5 μ l 混合,加 DEPC 水配制成 10 μ l 反应液,于 37℃反应 15 min,85℃变性 5 s;③PCR 扩增:参照 NYD-SP15 和人 β -actin 在 GenBank 中 mRNA 序列(AY027525 和 NM001101)分别设计 2 对引物,由上海生工生物公司合成,经 PAGE 纯化。NYD-SP15 上游引物:5'-AGTTGGGGCAGTCATTTGGG-3',下游引物:5'-TCCTTTCAGGCTCATTTTGTTC-3',扩增产物长度 449 bp;人 β -actin 上游引物:5'-A-CACTGTGCCATCTACGAGG-3';下游引物:5'-CTTTGCGGATGTCCACGTC-3',扩增产物长度 256 bp;④PCR 反应体系为:Premix Ex Taq 25 μ l,模板 2 μ l,上、下游引物各 1 μ l(10 p/mol),灭菌蒸馏水 21 μ l,总体积为 50 μ l。PCR 反应条件:98℃ 10 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环,72℃ 10 min,4℃ 5 min。人 β -actin 作阳性对照;⑤PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳分离鉴定;⑥取 PCR 产物

10 μ l 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,然后用 CS2930 薄层扫描仪(SH I2MADZU)扫描。使用英国 SYNGENE 凝胶成像分析系统,对扩增产物的电泳条带进行灰度扫描,分析测定积分吸光度值(IA)。每例标本 NYD-SP15 mRNA 的相对表达量以 NYD-SP15 片段的 IA 与 β -actin IA 的比值来表示,记录为 δ 。

1.2.2 免疫组化(抗生物素-生物素-过氧化物酶法即 ABC 法)

①石蜡切片脱蜡和水化:二甲苯 2 次,各 10 min;梯度酒精水化:无水 2 次、95%2 次、90%1 次、80%1 次;用 PBS(pH7.4)冲洗 3 次,每次 3 min;②3% H_2O_2 室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min,除去 PBS 液;③微波抗原修复:0.01 mol/L 柠檬酸盐微波修复;PBS(pH7.4)洗 3 次,每次 3 min;④正常山羊血清封闭,37℃,30 min;⑤分别滴加一抗孵育,室温下孵育 60 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,除去 PBS 液;⑥每张切片加 1 滴即用型 MaxVision™ 试剂,室温下孵育 15 min。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min,除去 PBS 液;⑦每张切片加 2 滴新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 5 min;自来水冲洗,苏木素复染,自来水冲洗返蓝,梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,显微镜观察、拍照。以 PBS 代替一抗进行同步染色为阴性对照。

结果判定:胞质或胞核呈浅棕黄色或深棕黄色者为阳性细胞,阴性细胞无着色。在正常牙龈组织、药物性牙龈增生组织、龈瘤组织及慢性牙龈炎组织上皮与结缔组织交界区各随机选取 5 个高倍视野($\times 400$),每个视野计数 100 个细胞中阳性细胞数,根据 5 个视野阳性细胞数比例的平均值将其分为 5 级:-: $< 10\%$;+: $10\% \sim 30\%$;++: $30\% \sim 60\%$;+++: $60\% \sim 90\%$;++++: $\geq 90\%$ 。其中 $\geq 50\%$ 即为强阳性。

1.3 统计学方法

定量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述;组间比较采用方差分析,两两比较采用 Scheffe 法;等级资料采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。采用 Stata 9.2 (Stata Corporation College Station, TX) 软件。 α 设为 0.05, P 值取双侧, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

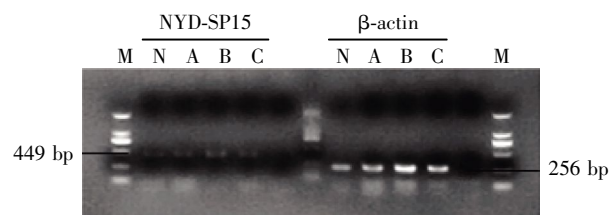
2 结果

2.1 牙龈组织中 NYD-SP15 基因 RT-PCR 结果

经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离鉴定,正常牙龈及增生牙龈组织均可扩增出小于 500 bp 的条带,与预期的 NYD-SP15 基因片段大小一致(图 1)。

2.2 牙龈组织中 NYD-SP15 基因的 mRNA 表达量分析

根据 RT-PCR 半定量结果,每份标本取其 2 次



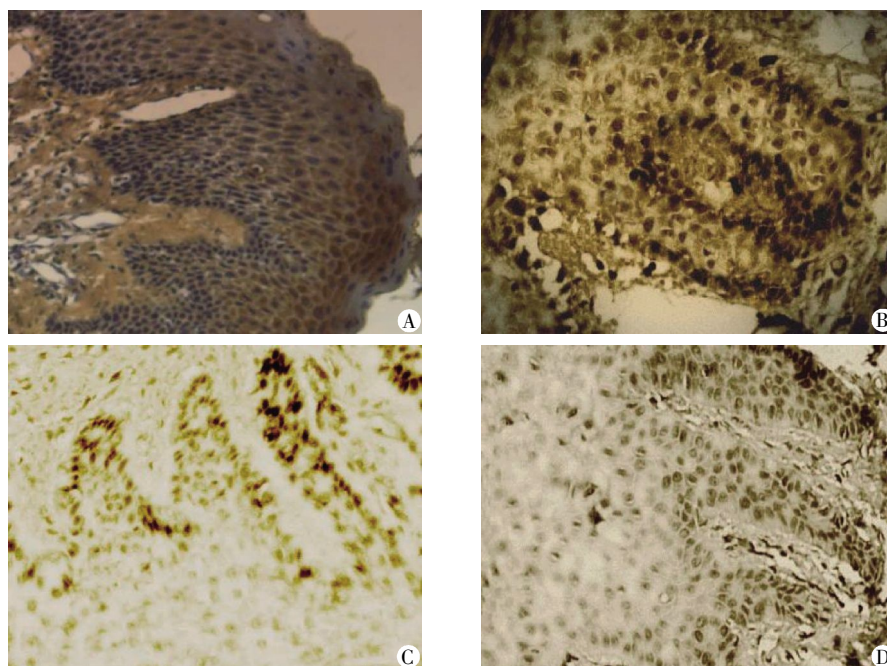
M: DL2000 Marker; N: 正常牙龈组织; A: 以增生表现为主的慢性牙龈炎; B: 药物性牙龈增生; C: 牙龈瘤。

图 1 NYD-SP15 基因 PCR 扩增后 1% 的琼脂糖凝胶电泳图
Figure 1 1% agarose gel showing the PCR products of the NYD-SP15 gene

IA 平均值, 计算出其表达值 δ , A、B、C 组增生牙龈组织中 NYD-SP15 mRNA 表达水平分别为 0.29 ± 0.12 、 0.37 ± 0.14 、 0.38 ± 0.10 , 均显著高于正常牙龈组织 0.06 ± 0.12 ($P < 0.05$)。增生牙龈组的平均表达水平为 0.35 ± 0.13 , 也显著高于正常牙龈组。

2.3 牙龈组织中 NYD-SP15 蛋白表达分析

NYD-SP15 在受检牙龈组织中均呈阳性表达。该蛋白主要位于基底细胞层和棘细胞层, 阳性细胞呈散在或弥漫分布。在正常牙龈组织中主要定位于胞浆(图 2A), 在增生牙龈组织中高表达于胞核(图 2B~D)。在不同组织中胞核阳性染色程度的分布情况详见表 2, 该基因在增生组织中表达的阳性率无统计学差异 ($P > 0.05$)。



A: NYD-SP15 在正常牙龈组织中高中表达于胞浆; B: NYD-SP15 在慢性牙龈炎组织高表达于胞核, 呈强阳性表达; C: NYD-SP15 在药物性牙龈增生组织中高表达于胞核, 呈强阳性表达; D: NYD-SP15 在牙龈瘤组织高表达于胞核, 呈强阳性表达。

图 2 牙龈组织中 NYD-SP15 蛋白的表达 ($\times 200$)

Figure 2 NYD-SP15 protein expression in gingival tissue ($\times 200$)

表 2 NYD-SP15 在不同组织中阳性染色程度的分布情况
Table 2 NYD-SP15 positive staining distribution in different tissues

分组	-	+	++	+++	++++	总例数
N 组	9	11	6	1	0	27
A 组	0	0	1	3	8	12
B 组	0	0	2	5	6	13
C 组	0	1	3	8	3	15

对结果观察值编秩,组间秩次方差分析显示: $F = 43.58, P < 0.000 1$;Scheffe 法分析显示:A、B、C 组与 N 组相比差异均有统计学意义, $P < 0.000 1$ 。

3 讨论

牙龈增生均具有相似的组织病理学特点,即细胞数量增多和大量基质堆积,同时炎症细胞也参与其组织病理学改变^[4]。学者们对于牙龈增生的发病机制作了大量的研究,主要集中于细胞增生过度 and 凋亡抑制、胶原合成与降解失衡及炎症反应等方面^[5-6]。对于调控牙龈增生发生的特异性基因及其功能研究尚处于探索阶段。

NYD-SP15 基因是在对生精过程的研究中,通过基因芯片和定量 PCR 发现一个与精子发生相关的新基因,在 GeneBank 中的序列号为 AY027525,定位于人类染色体 13q14.2。

在对其功能的前期研究工作中,Liu^[1]及 Wang^[7]等通过 RT-PCR 证明其在成熟的小鼠睾丸中高表达但在间质、精母细胞和精子中低表达或无表达;高表达于肿瘤细胞 HeLa 细胞,而在除睾丸细胞外的其他正常细胞中低表达;在增生性玻璃体视网膜病变视网膜增生组织中高表达。这些结果提示 NYD-SP15 确实与细胞的异常增殖有一定的关系^[8]。但其与牙龈增生发生机制相关性的研究尚未有报道。本研究结果亦显示,NYD-SP15 基因在增生牙龈组织中表达显著高于正常牙龈组织,推测 NYD-SP15 的表达上调导致细胞生长、增殖和凋亡的改变在牙龈增生发生中亦起重要作用。

大量研究发现胞苷脱氨酶存在穿梭作用,已知的脱氨酶基因多数低表达位于胞浆,高表达或刺激的情况下进入胞核,之后再回到胞浆锚定^[9-11]。由于胞苷脱氨酶一般分子量较小,其入核以自由扩散的模式是完全可行的,但是它们的入核却实际上受着严格的调控,或许也是细胞的一种自我保护机制,防止脱氨作用对核苷酸不必要的损伤。在这些脱氨酶中都存在入核信号和(或)出核信号序列,通过核孔复合物上的 importin 或 exportin 蛋白介导入核和出核,并可受药物的抑制^[12]。早期 Wang 等^[7]研究发现该蛋白在骨肉

中胞核高表达而视网膜色素上皮细胞中则是胞浆中表达为主。本研究免疫组化染色显示 NYD-SP15 蛋白在正常牙龈组织中高表达于胞浆,在增生牙龈组织中高表达于胞核。即在正常组织与增生组织中 NYD-SP15 蛋白表达定位有差异。提示该蛋白在发挥功能时亦可能存在胞核与胞浆间的穿梭作用。进一步分析其亚细胞定位对研究它的功能有重要作用。

[参考文献]

- [1] Liu Q, Liu J, Cao Q, et al. NYD-SP15, a novel gene potentially involved in regulating testicular development and spermatogenesis [J]. *Biochem Genet*, 2006, 44 (7-8): 409-423
- [2] Somasekaram A, Jarmuz A, How A, et al. Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(40): 28405-28412
- [3] 梅幼敏, 狄昌萍, 苏毅. 人特异性蛋白激酶-15 基因在药物性牙龈增生及正常牙龈组织中表达的研究[J]. *口腔医学*, 2010, 30(6): 355-357
- [4] 文海燕, 束蓉. 硝苯地平介导药物性牙龈增生的研究进展[J]. *国际口腔医学杂志*, 2009, 36(1): 84-87
- [5] 肖娟, 赵慧. 苯妥英钠性牙龈增生的病理机制[J]. *国际口腔医学杂志*, 2012, 39(2): 260-264
- [6] 刘培红, 马肃, 陈力. 环孢素对大鼠牙龈上皮细胞凋亡及 Bcl-2、Laspase-3 蛋白表达的影响 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2010, 29(3): 310-313
- [7] Wang Z, Liu Q, Chen J, et al. Prokaryotic expression plasmid of NYD-SP15 and preparation of polyclonal antibody [J]. *Int J Ophthalmol*, 2008, 8(3): 483-486
- [8] Lee S, Zheng M, Kim B, et al. Role of matrix metalloproteinase 29 in angiogenesis caused by ocular infection with herpes simplex virus [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(8): 1105-1111
- [9] Ito S, Nagaoka H, Shinkura R, et al. Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(7): 1975-1980
- [10] McBride KM, Barreto V, Nussen-zweig MC. Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase [J]. *J Exp Med*, 2004, 199(9): 1235-1244
- [11] Conticello SG. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators [J]. *Genome Biol*, 2008, 9(6): 229
- [12] Friedrich B, Quensel C, Sommer T, et al. Nuclear localization signal and protein context both mediate importin specificity of nuclear import substrates [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(23): 8697-8709