

[文章编号] 1000-1182(2006)01-0067-03

# 转录因子 c-Jun 和 c-Fos 在牙本质涎磷蛋白 基因表达中的作用

何文喜<sup>1</sup>, 牛忠英<sup>2</sup>, 赵守亮<sup>1</sup>, 李萍<sup>1</sup>, 高杰<sup>1</sup>

(1.第四军医大学口腔医院 牙体科, 陕西 西安 710032; 2.解放军306医院 口腔治疗中心, 北京 100101)

[摘要] 目的 研究成牙本质细胞内转录因子c-Jun和c-Fos在牙本质涎磷蛋白(DSPP)基因转录调控中的作用, 探索成牙本质细胞内DSPP基因表达的调控机制。方法 细胞免疫组化观察MDPC-23细胞内c-Jun和c-Fos蛋白分子的表达。瞬时转染和报告基因检测c-Jun和c-Fos在DSPP基因转录中的作用。结果 MDPC-23细胞表达c-Jun和c-Fos蛋白, c-Jun和c-Fos主要分布在MDPC-23细胞胞核。c-Jun或c-Fos过表达均显著抑制DSPP基因启动子活性。结论 证实成牙本质细胞内转录因子c-Jun和c-Fos参与下调DSPP基因表达。

[关键词] 牙本质涎磷蛋白; c-Jun; c-Fos; 基因转录

[中图分类号] R781.1 [文献标识码] A

Transcriptional Regulation of Dentin Sialophosphoprotein by c-Jun/c-Fos HE Wen-xi<sup>1</sup>, NIU Zhong-ying<sup>2</sup>, ZHAO Shou-liang<sup>1</sup>, Li Ping<sup>1</sup>, Gao Jie<sup>1</sup> (1. Dept. of Conservative Dentistry, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Dept. of Dentistry, PLA 306 Hospital, Beijing 100101, China)

[Abstract] Objective To investigate the role of c-Jun and c-Fos as transcriptional factors in regulation of dentin sialophosphoprotein(DSPP) gene by a promoter-luciferase reporter gene construct in odontoblast cell line MDPC-23.

Methods Endogenous c-Jun or c-Fos protein was determined by immunocytochemistry. The role of c-Jun or c-Fos in transcription of DSPP was investigated in co-transfection experiments using promoter-luciferase reporter gene construct containing the sequence between -791 bp and +54 bp of mouse DSPP gene. Results c-Jun and c-Fos was expressed by MDPC-23 cells, and located in the nucleus of MDPC-23 cells. Overexpression of c-Jun or c-Fos significantly inhibited luciferase activity of DSPP promoter. Conclusion These findings suggest c-Jun and c-Fos down-regulated the transcription of DSPP gene as a transcriptional factor in odontoblast.

[Key words] dentin sialophosphoprotein; c-Jun; c-Fos; gene transcription

牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)基因表达产物牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein, DSP)和牙本质磷蛋白(dentin phosphoprotein, DPP)在牙本质形成和矿化过程中发挥关键的调控作用<sup>[1]</sup>。近来研究<sup>[2]</sup>发现人DSPP基因突变导致Ⅰ型人牙本质发育不全疾病,而DSPP基因敲除小鼠牙本质发育缺陷,其症状类似于Ⅰ型人牙本质发育不全疾病<sup>[3]</sup>。这些证据进一步表明DSPP在牙本质形成和矿化中的重要作用。DSPP除了主要表达在成牙本质细胞和短暂表达在前成釉细胞<sup>[4]</sup>,研究<sup>[5]</sup>发现DSPP存在更广的分布范围,如大鼠长骨也存在少量DSPP表达;最近研究<sup>[6]</sup>发现DSPP表达在其他一些组织和细胞,如牙

槽骨、牙骨质细胞、牙周韧带中的成纤维细胞等。但这些组织和细胞内DSPP表达量均较低,如大鼠长骨中DSPP表达量是牙本质的1/400<sup>[6]</sup>。因而,对于不同组织和细胞,DSPP表达可能存在组织和细胞特异性。但是,对于什么因素决定组织和细胞内DSPP基因表达水平,国内外研究刚刚起步。本实验通过已成功构建的DSPP基因启动子报告基因载体<sup>[7]</sup>,利用成牙本质细胞系MDPC-23,观察核内转录因子c-Jun和c-Fos在DSPP基因表达中的作用,为以后阐明DSPP基因表达调控机制提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和仪器

-MEM细胞培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、LipofectAMINE 2000 reagent、Opti-MEM 培养基购置于美国Gibco BRL公司;免疫组

[收稿日期] 2004-09-23; [修回日期] 2005-05-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30200315)

[作者简介] 何文喜(1974-),男,湖北人,主治医师,博士

[通讯作者] 何文喜, Tel: 029-83376078

化试剂盒 Zemed公司, 美国); c-Jun和c-Fos多克隆抗体 Santa Cruz公司, 美国); 双荧光素酶报告基因检测系统和pRL-TK载体 Promega公司, 美国); Qiagen质粒提取试剂盒 Qiagen Plasmid Miniprep Kit(Qiagen公司, 德国); TD20/20型荧光发光计(Turner Biosystems公司, 美国)。

### 1.2 细胞培养

小鼠成牙本质细胞样细胞系MDPC-23由Hanks CK和Jacques E.Nor馈赠), 细胞培养在完全培养液中, 即含10% FBS的MEM、青霉素 $1 \times 10^5$  IU/L、链霉素100 mg/L和谷氨酰胺50 mg/L, 附加50 mg/L抗坏血酸, 培养置于37℃、含5% CO<sub>2</sub>孵箱中。

### 1.3 免疫组化染色

采用SP法。取固定好的细胞爬片, 依照试剂盒提供方法常规免疫组化染色。c-Jun或c-Fos多克隆抗体分别为1:200稀释的c-Jun或c-Fos多克隆抗体。DAB显色后, 常规脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。阴性对照组采用10%兔血清代替一抗, 其余处理同实验组。

### 1.4 质粒的提取

DSPP基因启动子报告基因载体pGL3LUC-P<sub>dspp</sub>-791-+54主要将DSPP基因启动子-791 bp至+54 bp片段, 连入pGL3-Enhancer<sup>[7]</sup>, pRSV-c-Jun和pRSV-c-Fos(日本东京Yamamoto K馈赠), 以及pRL-TK分别转化DH5感受态细胞, 挑取阳性克隆, 按照试剂盒说明书用Qiagen Plasmid Miniprep Kit提取质粒, 分光光度计定量后, -20℃保存备用。

### 1.5 瞬时转染和报告基因检测

为了进一步观察MDPC-23细胞内转录因子c-Jun和c-Fos在DSPP基因转录中的作用, 将c-Jun或c-Fos分别与DSPP报告基因载体pGL3LUC-P<sub>dspp</sub>-791-+54瞬时共转染到MDPC-23细胞。细胞转染参照LipofectAMINE 2000试剂说明书进行。细胞以每毫升 $5 \times 10^4$ 个浓度种植到24孔板, 细胞培养液为0.5 mL 10% FBS的MEM。24 h后, 用LipofectAMINE 2000进行细胞转染。对于每孔转染的细胞, 加入0.4 μg p3TP-luc、50 ng pRL-TK和c-Jun或c-Fos表达载体, 质粒总量保持在0.85 μg, 必要时加空对照载体pRSV替代, pRL-TK在细胞中组成型表达, 作为瞬时转染的对照报告基因, 校正不同的转染效率, 使实验的萤火虫报告基因正态化。细胞转染24 h后收集细胞, 用双荧光素酶报告基因检测系统检测细胞裂解液中的荧光素酶活性, 具体步骤见试剂说明书。所有萤火虫荧光素酶活性用海肾荧光素酶活性正态化, 所有的实验数据用3个样品同时检测, 取平均数值, 每个实验重复2次。实验数据采

用SPSS 10.0软件进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 c-Jun和c-Fos在MDPC-23细胞内的表达

从图1和图2结果可以看出, MDPC-23细胞存在c-Jun和c-Fos蛋白的表达, 其表达主要分布在细胞核。表明成牙本质细胞系MDPC-23细胞内存在转录因子c-Jun和c-Fos的表达。

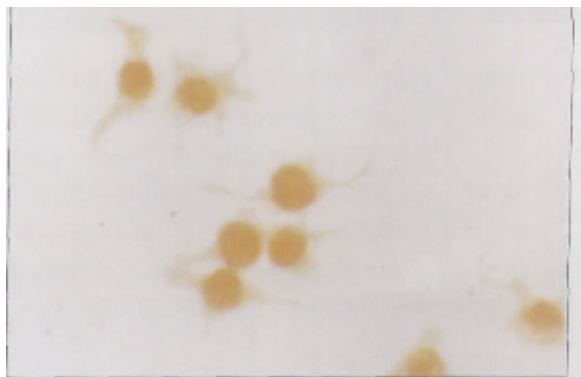


图1 c-Jun在MDPC-23细胞内胞核阳性染色 SP ×200  
Fig 1 Positive immunostaining of c-Jun located in the nucleus of MDPC-23 cells SP ×200

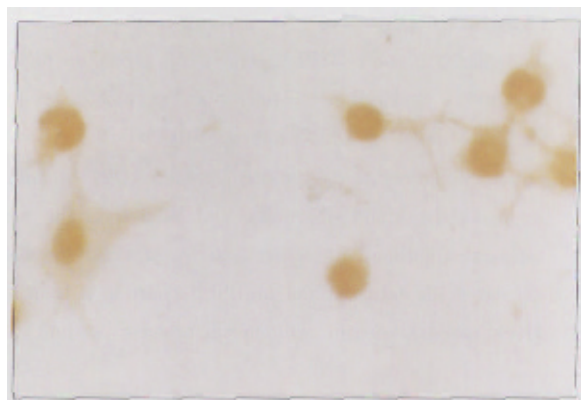


图2 c-Fos在MDPC-23细胞内胞核阳性染色 SP ×200  
Fig 2 Positive immunostaining of c-Fos located in the nucleus of MDPC-23 cells SP ×200

### 2.2 c-Jun和c-Fos调控DSPP基因表达

pGL3LUC-P<sub>dspp</sub>-791-+54在MDPC-23细胞内, 启动子活性较强。但是, 当c-Jun或c-Fos与pGL3LUC-P<sub>dspp</sub>-791-+54共转染后, c-Jun和c-Fos均显著下调pGL3LUC-P<sub>dspp</sub>-791-+54活性, 活性降低约50%, 表明在成牙本质细胞MDPC-23细胞内转录因子c-Jun和c-Fos下调DSPP基因转录。

## 3 讨论

c-Jun和c-Fos是核内原癌基因编码的蛋白分子, 能够被有丝分裂原刺激诱导, 包括激素、生长因子和粘附分子等, 在细胞分化过程中发挥重要的作用。c-Jun与c-Jun形成的同源二聚体或c-Jun与

c-Fos形成的二聚体在核内作为一种转录因子发挥作用,这种转录因子称为AP-1(activator protein-1)<sup>[8]</sup>。AP-1既能被生长因子如转化生长因子超家族成员、肿瘤坏死因子和上皮生长因子刺激诱导,也能被十四烷酰佛波醇乙酯刺激诱导<sup>[9]</sup>。活化后的AP-1通过识别靶基因启动子上的一段共同的DNA序列5'-TGA(C/G)TCA-3'调控目的基因的转录<sup>[9]</sup>。Feng等<sup>[10]</sup>通过克隆并分析小鼠DSPP基因启动子发现,在启动子上包含一些常见的转录因子结合位点,如AP-1、AP-2、MSX-1、血清反应元件、SP-1和TCF-1等,这些转录因子结合位点都存在于DSPP基因基础转录元件附近,表明这些转录因子可能正向或负向调控DSPP基因的表达。本实验所用的载体pGL3LUC-Pdssp-791-+54的小鼠DSPP启动子片段-791 bp至+54 bp之间就含有两个潜在的AP-1结合位点,c-Jun或c-Fos可能是通过与细胞内源性c-Jun或c-Fos相互作用形成转录因子AP-1,调控DSPP的表达。本实验结果表明转录因子c-Jun和c-Fos下调DSPP基因转录,从转录水平证实DSPP基因启动子存在c-Jun和c-Fos相互作用的结合位点。

国内外有关c-Jun和c-Fos在成牙本质细胞分化及牙本质基质形成中的研究较少。Kitamura等<sup>[11]</sup>研究发现,通常牙乳头细胞不表达c-Jun,在牙乳头细胞向成牙本质细胞分化的过程中,c-Jun表达逐渐增强,分泌牙本质基质的成熟成牙本质细胞则表达高水平的c-Jun,认为c-Jun参与调控成牙本质细胞分化,促进牙本质基质的分泌。但是,c-Jun和c-Fos形成的AP-1一般通过结合目的基因启动子上AP-1位点诱导目的基因的转录,包括牙本质基质蛋白成分骨钙素、碱性磷酸酶、型和型胶原,为何c-Jun和c-Fos下调成牙本质细胞内DSPP基因的转录,还需进一步研究。

c-Jun和c-Fos也是丝裂素活化蛋白激酶的底物。许多生长因子和细胞因子如上皮生长因子、血小板衍生生长因子、胰岛素、神经生长因子等的信号传递,通过激活其相应受体的酪氨酸蛋白激酶,然后通过细胞内一系列信号传递,最终使丝裂素活化蛋白激酶磷酸化,丝裂素活化蛋白激酶作用其下游底物,启动一系列胞浆和胞核反应的发生。上皮生长因子、血小板衍生生长因子、胰岛素、神经生长因子在成牙本质细胞分化过程中发挥重要的作用,它

们对DSPP表达的调控是否通过c-Jun/c-Fos实现,还需要进一步研究证实。

#### [参考文献]

- [1] Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix protein[J]. *Int J Dev Biol*, 1995, 39(1):169-179.
- [2] Zhang X, Zhao J, Li C, et al. DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta shields type [J]. *Nat Genet*, 27(2):151-152.
- [3] Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, et al. Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(27):24874-24880.
- [4] D Souza RN, Cavender A, Sunavala G, et al. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo[J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(12):2040-2049.
- [5] Qin C, Brunn JC, Cadena E, et al. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone[J]. *J Dent Res*, 2002, 81(6):392-394.
- [6] Baba O, Qin C, Brunn JC, et al. Detection of dentin sialoprotein in rat periodontium[J]. *Eur J Oral Sci*, 2004, 122(2):163-170.
- [7] 何文喜, 牛忠英, 赵守亮, 等. 小鼠牙本质涎磷蛋白启动子报告基因载体的构建和启动子活性分析[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2004, 14(7):373-377.  
(HE Wen-xin, NIU Zhong-ying, ZHAO Shou-liang, et al. Construction of mouse dentin sialophosphoprotein promoter reporter gene plasmids and analysis of promoter activity of plasmids[J]. *Chinese J Conserv Dent*, 2004, 14(7):373-377.)
- [8] Curran T, Franza BR Jr. Fos and Jun: The AP-1 connectin[J]. *Cell*, 1988, 55(3):395-397.
- [9] 何文喜, 牛忠英, 赵守亮, 等. rhBMP2作用下人牙乳头细胞内Smad1分子的转位变化[J]. *华西口腔医学杂志*, 2002, 20(6):398-400.  
(HE Wen-xi, NIU Zhong-ying, ZHAO Shou-liang, et al. The translocation of smad1 in human dental papilla cells treated with rhBMP2[J]. *West China J Stomatology*, 2002, 20(6):398-400.)
- [10] Feng JQ, Luan X, Wallace J, et al. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(16):9457-9464.
- [11] Kitamura C, Terashita M. Expressions of c-Jun and Jun-B proto-oncogenes in odontoblasts during development of bovine tooth germs[J]. *J Dent Res*, 1997, 76(4):822-830.

(本文编辑 汤亚玲)