

全反式视黄酸致小鼠腮弓畸形的机制研究

韩 静¹/肖 颖¹/林久祥²/

余增丽²/李 勇^{1,*}

(1. 北京大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 北京 100083; 2. 北京大学口腔医院, 北京 100081)

Mechanisms of All-trans Retinoic Acid-Induced Branchial Arch Malformations in Mice

HAN Jing¹, XIAO Ying¹, LIN Jiu-xiang²,

YU Zeng-li², LI Yong^{1,*}

(1. Department of Food Science and Nutrition, School of Public Health, Peking University, Beijing 100083, China; 2. School of Stomatology, Peking University, Beijing 100081, China)

【摘要】背景与目的: 研究全反式视黄酸 (All-Trans Retinoic Acid, RA) 对小鼠胚胎腮弓的致畸作用及其可能的致畸机制。材料与方法: 采用植入后全胚胎培养观察 RA 对孕 8.5 d 小鼠腮弓的致畸作用; 采用 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (Bromodeoxyuridine, BrdU) 标记及检测, 切口末端标记法, 切片和整体免疫组化观察 RA 对颅神经嵴细胞 (Cranial neural crest cells, NCC) 增殖、凋亡和迁移的影响。结果: RA 诱导腮弓出现发育不良, 发育不全, 第一、二腮弓融合畸形; RA 处理组腮弓 BrdU 掺入率减少, 凋亡增加, NCC 出现异常的迁移路径和方式。结论: RA 诱导腮弓畸形, NCC 增殖减少, 凋亡增加, 迁移改变是其可能的致畸机制。

【关键词】全反式视黄酸; 腮弓畸形; 神经嵴细胞; 增殖; 凋亡; 迁移

中图分类号: R114

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)03-0194-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To investigate the branchial arch malformations in all-trans retinoic acid (RA)-treated mouse embryos and its possible pathogenic pathways. MATERIAL AND METHODS: After whole embryo culture (WEC), mouse embryos treated with RA were examined for dysmorphogenesis (Scanning Electron Microscopy), cell proliferation (BrdU incorporation and detection method), cell apoptosis (TUNEL method), cranial neural crest cells (NCC) migration (sections and whole-mounts immunohistochemistry). RESULTS: During the whole culture period, RA-treated embryos showed branchial arch abnormalities including hypoplasia, agenesis, and fusion of first and second branchial arches. Increased apoptotic cells, decreased cell proliferation and anomalous NCC migration pathways were found in RA-treated embryos. CONCLUSION: These results suggested that branchial arches malformations induced by RA were related with the following possible pathogenetic mechanisms: increased cell apoptosis, inhibition of cell proliferation, and alteration of NCC migration.

【KEY WORDS】 all-trans retinoic acid; branchial arch malformations; neural crest cell; proliferation; apoptosis; migration pattern

全反式视黄酸 (All-trans retinoic acid, RA) 是维生素 A 的生物活性代谢物, 对胚胎正常发育和多种细胞分化起着重要作用。视黄酸缺乏或过量能诱导脊椎动物胚胎出现多种畸形, 其中腮弓 (Branchial arches, BAs) 具有很高的致畸敏感性, RA 诱导的腮弓畸形包括发育不良, 发育不全, 第一、二腮弓融合等^[3,4]。正常的腮弓发育

经过 3 个主要的过程: 颅神经嵴细胞 (NCC) 由中脑后部与后脑神经外胚层迁移到腮弓区域, 然后在腮弓内部增殖, 最后分化为相应的组织结构。NCC 迁移、增殖、分化的改变能 (Whole embryo culture, WEC) 够引起腮弓发育畸形。我们以孕 8.5 d 小鼠全胚胎培养为模型, 观察 RA 对腮弓的致畸作用并探讨其致畸机制。

收稿日期: 2005-03-21; 修订日期: 2005-12-19

基金项目: 国家“973”项目 (No. 2001CB510305)、国家自然科学基金 (No. 30371224)、北京市自然科学基金 (No. 7052040)

作者简介: 韩 静 (1978-), 女, 河南省鹤壁市人, 博士研究生, 研究方向: 发育毒理学。

* Correspondence to: LI Yong Tel: 86-10-82801177, Email: liyong@bjmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康性成熟 ICR 小鼠,由北京大学医学部动物部提供。雌雄鼠于 18:00 时按 1:1 合笼,次日晨检查阴栓,查见阴栓日定为妊娠 0 d,妊娠第 8 d 的 14:00 点定为孕 8.5 d。

1.1.2 试剂及仪器 全反式视黄酸(Sigma); 荧光 TUNEL 试剂盒 (Promage); 5- 溴脱氧尿嘧啶核苷 (Bromodeoxyuridine, BrdU) (Sigma); BrdU 抗体 (Sigma); CRABP I 抗体 (Santa Cruz); SP-9002, SP-9003 免疫组化试剂盒 (Zymed); 自制即刻离心大鼠血清 (Immediately Centrifugal Serum, ICS); 二甲基亚砷 (Dimethyl Sulphoxide, DMSO) (国产分析纯)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 RA 溶于 DMSO 配成不同浓度,随 ICS 加入培养瓶。实验按 RA 剂量分为 6 组,RA 终浓度为 0.01、0.1、0.2、0.4、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$,以 0.1% DMSO 为对照组。

1.2.2 胚胎移植与体外培养 脱颈处死孕 8.5 d 小鼠,消毒后剖腹取子宫,无菌环境中解剖显微镜下用钟表镊仔细剥离蜕膜、Reichert's 膜及壁层卵黄囊,将包裹脏层卵黄囊和羊膜的胚胎 (2~5 体节) 完好地移植到容积为 50 ml 含 ICS 的培养瓶中,每瓶 3~4 只,旋转培养箱连续培养 48 h (37.5 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 30~40 r/min)。分别于培养开始时、16、26 h 充入培养瓶内无菌过滤混合气体 2.5 min,其比例 (O_2 : CO_2 : N_2) 变化依次为 5:5:90; 20:5:75; 40:5:55。48 h 培养终点后,在 0, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ RA 组,每组至少从 3 瓶不同的培养瓶中取出 6 只胚胎进行增殖、凋亡、迁移的相应检测。

1.2.3 扫描电镜观察 WEC 培养 48 h 后,胚胎经 3% 戊二醛固定 2 h, 1% 锇酸固定 2 h, 梯度乙醇脱水,乙酸异戊酯置换 20 min,二氧化碳临界点干燥后离子溅射仪镀膜,置 JEOL 电镜下扫描观察。

1.2.4 BrdU 掺入与检测 培养终点前 2 h,将 1% BrdU (25 mg/ml) 加入培养基中,继续培养至终点收获胚胎。4% 多聚甲醛固定,常规酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片 (厚 5 μm),以二甲苯脱腊及系列酒精入水。PBS 3 次 \times 5 min。3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶 10 min,羊血清室温封闭 15 min,倾去勿洗。滴加 1:500 稀释的鼠抗 -BrdU 单克隆抗体,湿盒 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 3 次 \times 5 min。按照 SP-9002 免疫组化试剂盒进行生物素化二抗和辣根酶标记链霉卵白素结合。DAB 显色,常规封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.5 TUNEL 检测 切片入二甲苯、酒精逐级

脱水。0.85% NaCl 5 min。PBS 5 min。4% 多聚甲醛 15 min。PBS 2 次 \times 5 min。20 $\mu\text{g/ml}$ 蛋白酶 K 8~10 min。PBS 5 min。4% 多聚甲醛 5 min。PBS 5 min。Buffer 液平衡 5~10 min。加 TUNEL 反应液 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒避光数 1 h。2 \times SSC 室温浸泡 15 min 以终止反应。PBS 3 \times 5 min,去除未结合的 fluorescein-12-dUTP。荧光显微镜下观察。以不加末端转移酶作为阴性对照;以 DNase 酶预先消化作为阳性对照。

1.2.6 阳性细胞率统计方法 从每组切片中随机选取 5 张切片,在 400 高倍镜下计数 500 个细胞,并计数其中阳性细胞数。按以下公式计算 BrdU 掺入率和凋亡指数:

$$\text{BrdU 掺入率}(\%) = \frac{\text{BrdU 阳性细胞数}}{500} \times 100.$$

$$\text{凋亡指数}(\%) = \frac{\text{TUNEL 阳性细胞数}}{500} \times 100.$$

1.2.7 CRABP I 切片免疫组化 CRABP I (Cellular retinoic acid binding protein) 是 NCC 的标志蛋白,可以与 NCC 特异结合。切片以二甲苯脱腊及系列酒精入水。PBS 3 次 \times 5 min。3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶 10 min,免血清室温封闭 15 min,倾去勿洗。滴加 1:1000 稀释的羊抗 -CRABP I 多克隆抗体,湿盒 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 3 次 \times 5 min。按照 SP-9003 免疫组化试剂盒进行生物素化二抗和辣根酶标记链霉卵白素结合。DAB 显色,常规封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.8 CRABP I 整体免疫组化 收获的胚胎用 Dent's 固定液 (DMSO: 甲醇 = 1:4) 固定 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。甲醇浸洗,5% H_2O_2 甲醇溶液孵育,滴加 1:1000 稀释的羊抗 -CRABP I 多克隆抗体,湿盒 4 $^{\circ}\text{C}$ 3 d。按照 SP-9003 免疫组化试剂盒进行生物素化二抗和辣根酶标记链霉卵白素结合。DAB 显色,常规封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.9 统计学方法 用 SPSS 10.0 软件建立数据库并进行方差分析 (LSD 或 Dunnett's T3 法),两样本均数的比较进行 t 检验, $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 胚胎腮弓形态 小鼠全胚胎培养 48 h 后,RA 处理组胚胎出现多种腮弓畸形:发育不良,发育不全,第一、二腮弓融合 (Fused Branchial Arch, FBA) (表 1)。在许多研究中,对于腮弓畸形只有定性指标分析^[1],而通常采用的 Van 法形态学评分系统中腮弓的定量指标是腮弓个数^[2]。我们的研究引入了一个新的腮弓定量评分指标,第一腮弓长度,即下颌突的长度 (图 1A)。生理浓度 (0.01



$\mu\text{mol/L}$ RA 对腮弓无不良影响。RA $\geq 0.1 \mu\text{mol/L}$ 时,第一腮弓长度(Y_L)与腮弓个数(Y_N)随 RA 剂量(X)的增加而下降。但两者下降速度不同,其对数曲线回归方程分别为:

$$\hat{Y}_N = 1.642 - 0.849 \lg X, r = -0.947, P = 0.002$$

$$\hat{Y}_L = 0.204 - 0.111 \lg X, r = -0.977, P = 0.000,$$

两回归系数不同($t = 5.093, P < 0.01$),其中腮弓个数随 RA 的增加而下降速度快。0.4 $\mu\text{mol/L}$ 组致畸明显,且胚胎死亡率不高(29.4%),所以我们选择 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 组的胚胎作进一步致畸机制的相关研究。

由 SEM 可见三种典型的腮弓畸形。一是发育不良,对照组第一腮弓(包括上、下颌突)比第二、三腮弓更粗大(图 1A),而 0.4 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理组第一腮弓相比明显瘦小(图 1B)。二是发育不全,如第三腮弓缺失(图 1B)。三是腮弓融合,图 1C 可见第一、二腮弓明显融合。

表 1 RA 对小鼠胚胎腮弓发育的影响

Table 1 Effects of RA on branchial arches development of cultured mouse embryos ($\bar{x} \pm s$)

RA ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Number of embryos	Number of BA	Length of BA (mm)
0	33	3.00 \pm 0.00	0.41 \pm 0.07
0.01	20	3.00 \pm 0.00	0.40 \pm 0.03
0.1	20	2.60 \pm 0.30**	0.32 \pm 0.06**
0.2	23	2.39 \pm 0.23**	0.30 \pm 0.06**
0.4	34	2.16 \pm 0.37**	0.26 \pm 0.05**
1.0	36	1.93 \pm 0.28**	0.23 \pm 0.04**
10.0	20	0.40 \pm 0.16**	0.06 \pm 0.03**

** Significantly different from the control, $P < 0.01$.

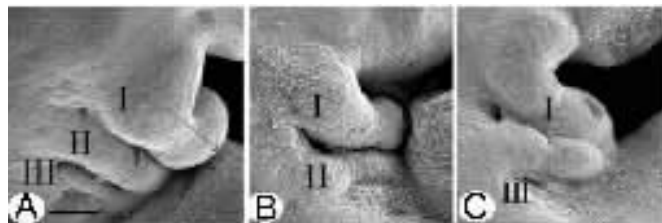


图 1 RA 诱导小鼠胚胎腮弓出现畸形(标尺, 100 μm)

Figure 1 Malformations in branchial arches induced by RA treatments in mouse embryos (Bar, 100 μm). A: Control; B, C: 0.4 $\mu\text{mol/L}$ RA exposure group

2.2 BrdU 掺入结果 BrdU 能掺入 S 期细胞新合成的 DNA 链中, BrdU 掺入率可以作为细胞增殖的指标。被 BrdU 标记的 S 期细胞, DAB 染色其胞核呈棕黄色。用 BrdU 掺入法检测腮弓 NCC 增殖情况,结果显示, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理组腮弓 BrdU 掺入率比对照组减少了 62% (表 2)。

表 2 RA 对 BrdU 掺入率的影响

Table 2 Effects of RA on BrdU incorporation of branchial arches ($\bar{x} \pm s$)

RA ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Number of embryos	BrdU-positive cells ($\times 10^{-2}$)
0	22	45.8 \pm 3.1
0.4	24	17.4 \pm 2.5**

** Significantly different from the control, $t = 34.33, P < 0.001$.

2.3 TUNEL 结果 结果显示, 凋亡细胞呈现明亮的黄绿色荧光。对照组只有散在的少量凋亡细胞存在,而 0.4 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理组凋亡细胞明显增加。凋亡指数(AI)处理组比对照组约增加了 6 倍(图 2, 表 3)。

表 3 RA 对腮弓凋亡的影响

Table 3 Effects of RA on apoptosis of branchial arches ($\bar{x} \pm s$)

RA ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Number of embryos	Apoptosis index ($\times 10^{-2}$)
0	23	4.8 \pm 1.2
0.4	24	28.5 \pm 2.7**

** Significantly different from the control, $t = 38.59, P < 0.001$.

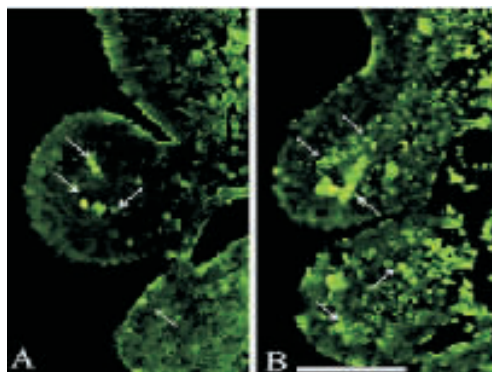


图 2 RA 对腮弓凋亡的影响(标尺, 40 μm)

Figure 2 Apoptotic changes in branchial arches of RA-exposed embryos. Sections were stained with TUNEL. A: Control; B: 0.4 $\mu\text{mol/L}$ RA exposure group

2.4 切片免疫组化结果 对照组第一腮弓 CRABP I 表达较第二、三腮弓弱(图 3A),而 0.4 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理组第一腮弓 CRABP I 表达上调,与第二、三腮弓表达强度相似(图 3B);在 FBA 中,前后部分表达强弱没有明显的分别(图 3C)。对照组第一、二腮弓中, CRABP I 表达阳性的 NCC 分布于腮弓的周围, CRABP I 表达阴性的 PMC 居于腮弓的中心(图 3D);而 0.4 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理组 NCC 与 PMC 混杂分布于腮弓中,失去了正常的分布状态(图 3E, F)。

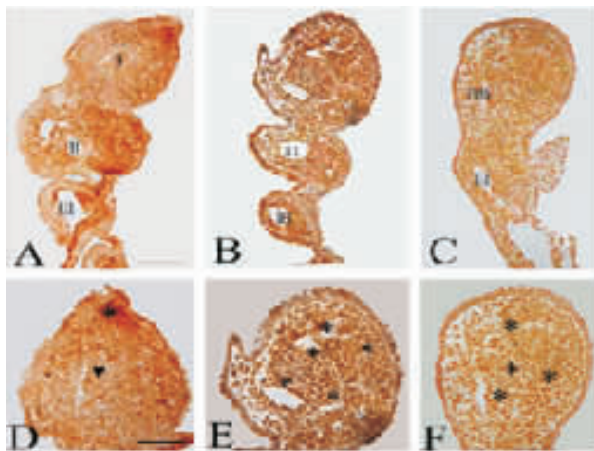


图 3 RA 对腮弓 CRABP I 表达的影响(标尺: A, 100 μm ; D, 50 μm)
Figure 3 Immunohistochemical localization of CRABP I in branchial arches. A: Control; B, C, E, F: 0.4 $\mu\text{mol/L}$ RA exposure group

2.5 整体免疫组化结果 对照组由菱脑到腮弓出现 3 条清楚的 NCC 迁移路径, 并且凝集于第一、二、三腮弓(图 4A)。0.4 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理组显示了异常的 NCC 迁移状况, 外胚间充质组织无法凝集, 沿着腮弓形成了连续扩散的阳性细胞团(图 4B)。

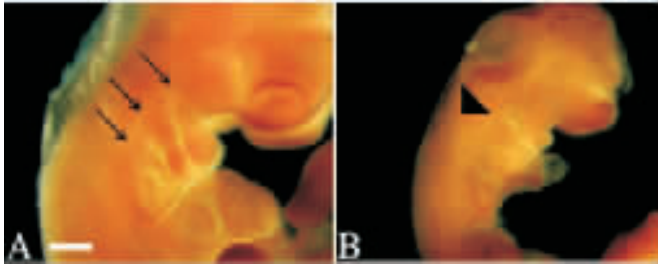


图 4 RA 对 NCC 迁移的影响 (标尺, 200 μm)

Figure 4 Anomalous migration of cranial neural crest cells (NCC) of RA-treated embryos. A: Control; B: 0.4 $\mu\text{mol/L}$ RA exposure group

3 讨论

本实验研究了 RA 诱导全胚胎培养小鼠出现的腮弓畸形及其致畸机制。RA 诱导的小鼠腮弓畸形有发育不良, 发育不全和第一、二腮弓融合, 并在一定的剂量范围内呈现剂量-效应关系。这与以前 RA 诱导腮弓畸形的研究结果一致。

RA 对于细胞增殖、凋亡、分化具有多样的作用。腮弓的减小可以归因于细胞增殖的减少和凋亡的增多。已有的研究显示维生素 A 类能够显著影响体内或体外胚胎神经嵴及 NCC 的增殖^[3]。与以往研究结果一致, 本实验结果 RA 处理组 BrdU 掺入率比对照组下降了 62%, 表明 RA 能够明显抑制腮弓 NCC 增殖。对此现象的解释有一些假说。一种假说是转录因子的缺失引起压力反应, 从而造成细胞周期中通过 S 期的时程减缓。另一种是细胞周期因子本身的异常表达导致增殖减少^[4]。TUNEL 结果表明 RA 诱导腮弓 NCC 凋亡明显增加, 处理组 AI 约为对照组的 6 倍。Evrard 等^[5]研究也得到了相似的结果, 给与小鼠 RA 后, 经 TUNEL 及透射电镜观察证实小鼠第一、二腮弓凋亡增加。这些结果提示, 腮弓的减小或缺失部分由于 NCC 的凋亡。我们进行了 BrdU, TUNEL 的检测, 结果提示腮弓的减小可能部分由于腮弓间充质细胞增殖减慢及由此造成的凋亡, 以清除这些增殖过缓的细胞。

后脑来源的 NCC 通常形成三条接近于 2, 4, 6 菱脑节的清楚的迁移路径, 分别形成第一、二、三腮弓^[6]。RA 诱导异常迁移路径的形成从而改变了正常的迁移模式: 只有一条或两条异常的迁移路径, 或非凝聚的弥散状

态。研究结果与以往的研究相似^[3]。RA 对 CRABP I 表达情况的改变也表明了其对 NCC 迁移的影响。RA 处理组 NCC 与 PMC 失去了正常的界限明确分布状态, 混杂在一起, 表明 NCC 迁移发生了改变。第一腮弓的 NCC 异常迁移进入第二腮弓, 或者反之, 其结果造成了第一、二腮弓融合^[7]。NCC 相关基因突变也能造成 NCC 的异常迁移。有研究显示, ErbB4 缺失的小鼠出现了后脑源的 NCC 亚群的异常迁移^[8]。对爪蟾进行的研究表明周围神经嵴线依赖于 ephrins 及其受体。干扰其受体配体相互作用导致嵴线的混杂^[9]。可见, RA 有可能通过阻碍介导 NCC 迁移的基因, 如 ErbB4, Eph 受体及其配体诱导 NCC 的异常迁移。

参考文献:

- [1] Lee YM, Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, *et al.* Retinoic acid stage-dependently alters the migration pattern and identity of hindbrain neural crest cells[J]. *Development*, 1995, 121(3): 825 - 37.
- [2] Van MFG, Delhaise F, Picard J T. Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos[J]. *Toxicol in Vitro*, 1990, 4(1): 149 - 156.
- [3] Salvarezza SB, Rovasio RA. Exogenous retinoic acid decreases *in vivo* and *in vitro* proliferative activity during the early migratory stage of neural crest cells[J]. *Cell Prolif*, 1997, 30(2): 71 - 80.
- [4] Harper JW, Elledge SJ. Cdk inhibitors in development and cancer[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, 6(1): 56 - 64.
- [5] Evrard L, Vanmuylder N, Dourov N, *et al.* Correlation of HSP110 expression with all-trans retinoic acid-induced apoptosis [J]. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 2000, 20(4): 183 - 92.
- [6] Kulesa PM, Fraser SE. *In vivo* time-lapse analysis of chick hindbrain neural crest cell migration shows cell interaction during migration to the branchial arches[J]. *Development*, 2000, 127(6): 1161 - 1172.
- [7] Wei X, Makori N, Peterson PE, *et al.* Pathogenesis of retinoic acid-induced ear malformations in a primate model[J]. *Teratology*, 1999, 60(2): 83 - 92.
- [8] Golding JP, Trainor P, Krumlauf R, *et al.* Defects in pathfinding by cranial neural crest cells in mice lacking the neuregulin receptor ErbB4[J]. *Nature Cell Biol*, 2000, 2(2): 103 - 109.
- [9] Smith A, Robinson V, Patel K, *et al.* The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells[J]. *Curr Biol*, 1997, 7(8): 561 - 570.