

[文章编号] 1000-1182(2008)05-0546-04

腭发育不同时期维甲酸对腭突细胞增殖和凋亡的影响

王如¹, 刘彬², 王博², 丛蔚², 肖晶²

(1.大连医科大学附属第一医院 口腔科, 辽宁 大连 116011;

2.大连医科大学口腔医学院 口腔基础教研室, 辽宁 大连 116044)

[摘要] 目的 研究维甲酸对小鼠腭突融合期细胞增殖和细胞凋亡的影响。方法 在SPF级C57BL/6J近交系母鼠妊娠10 d和12 d给予维甲酸(RA)建立小鼠腭裂模型,利用BrdU免疫组化方法和脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测胚胎15 d(即腭突融合期)小鼠腭突中细胞增殖及细胞凋亡的表达和分布。结果 10 d给药组腭间充质细胞及腭中嵴上皮细胞中BrdU阳性细胞率和TUNEL阳性细胞率均低于对照组,12 d给药组和对照组BrdU阳性细胞率和TUNEL阳性细胞差异无统计学意义。结论 维甲酸作用于腭发育的不同时期对腭突细胞增殖及凋亡水平有不同的影响,作用于腭突发生前期可引起腭间充质细胞增殖抑制、凋亡过度而发生腭裂,作用于腭突快速生长期可能影响腭中嵴上皮细胞的上皮间充质转化和迁移等其他转归形式。

[关键词] 腭裂; 维甲酸; 细胞增殖; 细胞凋亡

[中图分类号] R782.2*2 **[文献标识码]** A

Spatial and temporal changes of palatal cell proliferation and cell apoptosis of retinoic acid induced mouse cleft palate in different embryonic stages WANG Ru¹, LIU Bin², WANG Bo², CONG Wei², XIAO Jing². (1. Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China; 2. Dept. of Basic Oral Science, College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of retinoic acid(RA) on cell proliferation and apoptosis of palatal shelves by 5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU) and terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling(TUNEL). **Methods** C57BL/6J mice were used to establish the RA induced cleft palate animal model, in which the pregnant mice were given a single dose of RA at 100 mg/kg body weight on gestation day 10(GD10) and GD12, respectively. Specimens were prepared for immunohistochemical staining by using BrdU and TUNEL monoclonal antibodies. **Results** The percentages of BrdU positive cells of embryonic palatal mesenchyme(EPM) and medial edge epithelium(MEE) in GD10 RA group were both obviously lower than that of control group. There was no difference between GD12 RA group and control group. Abnormally intense staining of TUNEL was detected in the palatal mesenchymal cells of GD10 day RA group but not in control group and GD12 day RA group. **Conclusion** After exposure of embryonic mice to RA on GD10, the proliferation and apoptosis of palatal mesenchymal cells are increased, this causes the smaller size of shelves and failure of fusion. The MEE cells keep a bilayer midline epithelial seam after exposure on GD12 with normal apoptosis, this indicates that cell apoptosis in MEE cells be not the only process required for palatal fusion.

[Key words] cleft palate; retinoic acid; cell proliferation; cell apoptosis

维甲酸(retinoic acid, RA)的致畸作用比较显著,在腭突生长的不同时期摄入RA所诱导的腭裂形式不同,但其机制尚不明确。近年来一些研究表

明,腭突中嵴上皮细胞和腭突间充质细胞的增殖和凋亡对腭部的正常发育具有重要作用,与腭裂的形成密切相关。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)是一种检测细胞增殖的非放射性标记物,是反映细胞增殖及跟踪监测增殖细胞的理想指标。细胞凋亡(apoptosis)广泛存在于胚胎发育过程中,也同样存在于腭突发育及腭裂形成的过

[收稿日期] 2008-02-21; [修回日期] 2008-06-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30400504); 辽宁省教育厅基金资助项目(2004D131)

[作者简介] 王如(1961-),女,辽宁人,教授,博士

[通讯作者] 肖晶, Tel 0411-86110400

程中。有学者认为,过量的RA诱导了腭间充质细胞的凋亡,并影响了腭中嵴上皮细胞的转归而导致腭裂。脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)是分子生物学与形态学相结合的研究方法,通过对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色,有效而准确地定位凋亡细胞。

本实验分别在腭突发生不同时期即妊娠10 d和妊娠12 d给予母鼠维甲酸,采用冠状面连续切片来观察腭突组织。利用BrdU标识腭突增殖细胞,利用TUNEL法标识凋亡细胞,通过研究腭中嵴上皮细胞和腭间充质细胞在腭突融合期发生细胞增殖和细胞凋亡的水平 and 分布变化,探讨作用于腭突发生的不同时期的维甲酸所诱导腭裂的发生机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级C57BL/6J近交系小鼠由大连医科大学实验动物中心提供,10周龄左右,雄鼠体重24 g以上,雌鼠体重20 g以上。

1.2 实验用药

维甲酸用美国Sigma公司的全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA), -20 °C冰箱内避光保存。

1.3 免疫组织化学试剂

胰蛋白酶消化液、变性溶解液、阻断溶解液及BrdU试剂盒购于美国Zymed公司。蛋白酶K及TUNEL试剂盒购于日本宝生物公司。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠腭裂模型的建立 选取10周龄左右SPF级C57BL/6J近交系小鼠,于第1天晚8时按雌雄比2:1合笼交配。第2天上午8时检测阴栓,将阴栓阳性的雌鼠记妊娠0 d(gestation day 0, GD0)。将孕鼠随机分为3组,第1组(10 d给药组)和第2组(12 d给药组)孕鼠分别在GD10上午10时、GD12上午10时按100 mg/kg体重进行维甲酸灌胃;第3组孕鼠灌胃植物油0.2 mL作为对照。全部孕鼠于GD15上午10时处死,拟进行BrdU染色实验的小鼠处死前20 min按100 mg/kg体重腹腔注射BrdU。共获得10 d给药组胎鼠75只,12 d给药组胎鼠40只和对照组胎鼠40只,体视显微镜下观察胎鼠的大体形态。

1.4.2 标本处理 从颈部分离胎鼠的头部,在新鲜配置的4%中性多聚甲醛中4 °C下固定5 h,序列乙醇脱水,浸蜡。头部喙部朝下,常规石蜡包埋,5 μm厚连续切片。苏木精-伊红染色,镜下观察胎鼠腭部发育状况和形态变化,选择良好的切片标本进行

BrdU染色和TUNEL染色。

1.4.3 BrdU染色 1)石蜡包埋的组织切片预处理。将石蜡组织切片二甲苯脱蜡,梯度乙醇回水后,用PBS冲洗3次;再置于体积分数为3%双氧水中室温孵育10 min, PBS冲洗3次。2)滴加胰蛋白酶消化液,37 °C温箱孵育30 min,用PBS冲洗3次。3)滴加变性溶解液,室温孵育30 min,用PBS冲洗3次;滴加阻断液,室温孵育8 min;滤纸吸干阻断液后,直接滴加生物素标记小鼠抗BrdU单克隆抗体,4 °C孵育1 h,用PBS冲洗3次。4)滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶,室温孵育10 min,用PBS冲洗3次。5)滴加新鲜配置的DAB溶液,着色后流水冲洗,苏木素复染。6)切片经梯度乙醇脱水,二甲苯浸洗固定,中性树胶封片。

1.4.4 TUNEL染色 1)石蜡包埋的组织切片预处理。2)把预先配置好后冰冻放置的反应液50 μL(TdT Enzyme 5 μL; Labeling Safe Buffer 45 μL)加至载玻片上,于37 °C湿盒中反应60~90 min, PBS清洗停止反应。3)在载玻片上加Anti-FITC HRP Conjugate于37 °C的潮湿环境中反应30 min, PBS清洗。4)DAB发色至呈现浅棕色,蒸馏水清洗停止反应。5)乙醇梯度脱水,二甲苯浸洗固定,树脂封片。

2 结果

2.1 腭突融合期组织形态学改变及维甲酸对其影响的观察

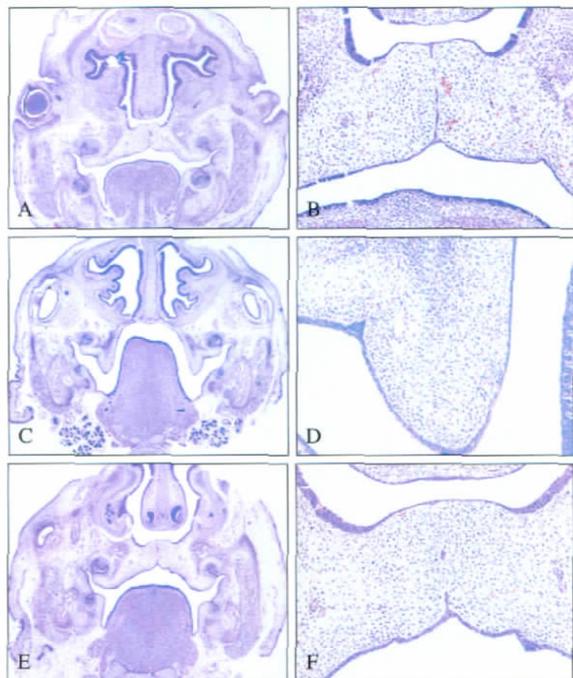
体视显微镜下,观察胚胎15 d(即腭突融合期)小鼠胚胎及其腭发育。结果如下:对照组40只胎鼠的双侧腭突已紧密结合,四肢及尾发育正常;10 d给药组的75只胎鼠上腭全部裂开,鼻中隔暴露,其中3只见下肢畸形,2只尾短缩;12 d给药组的40只胎鼠的双侧腭突已接触,四肢及尾发育正常。

在光学显微镜下,观察苏木精-伊红染色的15 d(即腭突融合期)鼠胚腭部冠状面连续切片。结果如下:对照组舌体下降,腭突水平生长;高倍镜下可见双侧腭突接触后形成的中嵴上皮带断裂形成上皮岛,部分中嵴上皮消失后使双侧间充质互相贯通;10 d给药组未见舌体下降,双侧腭突位于舌两侧呈垂直向生长,未发生接触;高倍镜下可见腭突间充质细胞间距较大,中嵴细胞呈复层排列;12 d给药组的双侧腭突水平生长并接触;高倍镜下可见中嵴上皮条带较对照组完整(图1)。

2.2 腭突融合期BrdU阳性细胞在腭突细胞中的表达分布

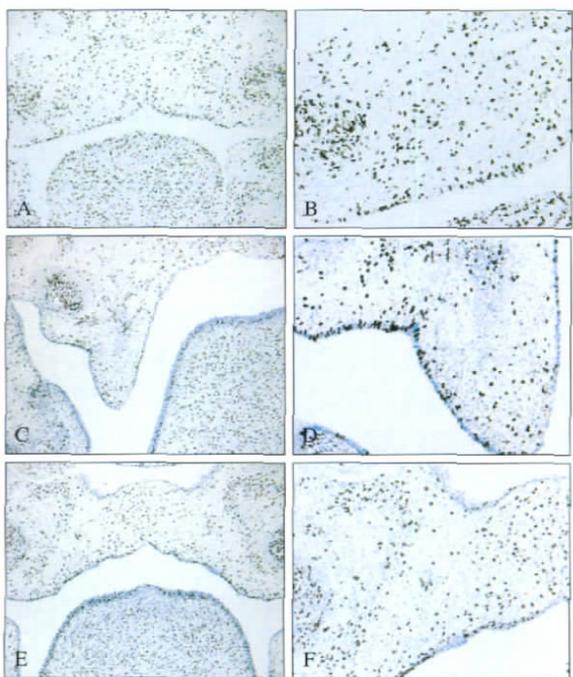
BrdU阳性细胞为胞核的特异性深褐色标识。胚胎15 d即腭突融合期,对照组BrdU阳性细胞大量分

布于间充质和中嵴上皮中；10 d给药组BrdU阳性细胞散在分布于间充质和中嵴上皮中，数量明显低于对照组；12 d给药组BrdU阳性细胞的分布和数量与对照组差异无统计学意义(图2)。



A, B: 对照组; C, D: 10 d给药组; E, F: 12 d给药组
图1 腭突融合期组织形态学改变 HE A, C, E ×25; B, D, F ×100

Fig 1 Histological and morphological changes during the stage of palatal fusion HE A, C, E ×25; B, D, F ×100

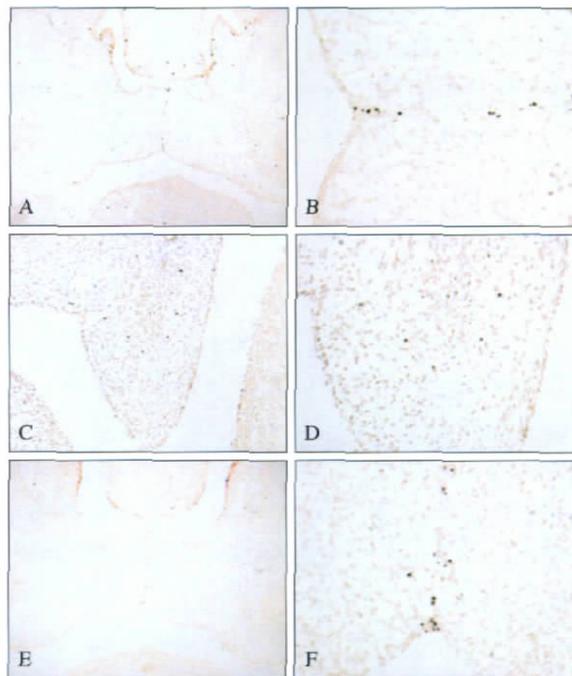


A, B: 对照组; C, D: 10 d给药组; E, F: 12 d给药组
图2 腭突融合期, 冠状面切片BrdU阳性细胞的表达及分布 BrdU A, C, E ×100; B, D, F ×400

Fig 2 Expression and distribution of BrdU positive cells in frontal sections during the stage of palatal fusion BrdU A, C, E ×100; B, D, F ×400

2.3 腭突融合期TUNEL阳性细胞在腭突细胞中的表达分布

TUNEL阳性细胞均为胞核的特异性深褐色标识。在胚胎15 d即腭突融合期, 对照组TUNEL阳性细胞特异性分布于腭中嵴上皮以及鼻腔面腭上皮细胞, 腭间充质中未见TUNEL阳性细胞; 10 d给药组TUNEL阳性细胞散在分布于腭间充质中, 数量明显多于对照组, 而腭中嵴上皮以及口腔和鼻腔面上皮未见TUNEL阳性细胞; 12 d给药组TUNEL阳性细胞分布及数量与对照组差异无统计学意义(图3)。



A, B: 对照组; C, D: 10 d给药组; E, F: 12 d给药组
图3 腭突融合期, 冠状面切片TUNEL阳性细胞的表达及分布 TUNEL A, C, E ×100; B, D, F ×400

Fig 3 Expression and distribution of TUNEL positive cells in frontal sections during the stage of palatal fusion TUNEL A, C, E ×100; B, D, F ×400

3 讨论

腭的发育是一个复杂的演变过程, 有严密的规律, 并表现出精确的时间顺序与空间关系, 包括细胞的增殖、分化、相互识别及凝聚等过程。有学者认为腭间充质细胞生长抑制和过度凋亡是导致腭裂和其他颌面部先天畸形的主要原因^[1]。在正常腭间充质细胞中可出现少量散在分布的凋亡细胞, 其功能可能是清除个别病变的腭间充质细胞; 维甲酸作用于腭间充质细胞后能阻断细胞周期G₁/S转化^[2]。经维甲酸作用后的腭间充质细胞在快速增殖期却出现大量的凋亡细胞, 使参与腭突发育及融合的细胞数量减少, 是导致腭裂的原因之一^[3]。在本实验中, 10 d(即腭突发生前期)给药组小鼠摄入大量外源性

维甲酸后,在腭突融合期的腭间充质细胞中细胞增殖抑制,并且出现过多非正常的细胞凋亡,使腭突形态和体积受到影响,出现双侧腭突短缩,接触失败导致腭裂;而12 d(即腭突垂直快速生长期)给药组小鼠的腭间充质细胞增殖水平与对照组无显著性差异,未出现过量的细胞凋亡,双侧腭突形态、体积与对照组无明显差异,双侧腭突已上抬并接触。此结果提示了维甲酸作用于腭突发生的不同时期对腭间充质细胞增殖和凋亡水平均有不同的影响,维甲酸作用于腭突发生前期,引起腭间充质细胞生长抑制和凋亡过度是腭裂发生的细胞生物学基础。

腭中嵴上皮细胞的最终转归包括3种形式:退化或凋亡;上皮—间充质转化;腭中嵴上皮细胞迁移入口腔上皮和鼻腔上皮。Taniguchi等^[4]研究显示腭的发育中,左右腭突生长融合必须通过腭中嵴上皮细胞不断凋亡而完成。腭突融合时期,腭中嵴上皮细胞凋亡水平过低可使中线上皮残存,阻止双侧腭突的融合或发生融合后的再裂开。在腭突融合期,上皮细胞岛周围的间充质中有凋亡小体存在,这些凋亡小体的DNA片段标记物在腭中嵴上皮细胞和腭突融合期的鼻腔上皮有表达^[5],凋亡小体最终被吞噬细胞所清除^[6]。本实验中,对照组及12 d给药组小鼠双侧腭突均已上抬并接触,中嵴上皮细胞中TUNEL阳性细胞呈散在分布;而10 d给药组小鼠双侧腭突短缩,未上抬接触,腭中嵴上皮细胞的TUNEL阳性细胞显著低于对照组及12 d给药组,提示双侧腭突接触可能是中嵴上皮细胞凋亡发生的先决条件。

Shuler等^[7]以Dil标记腭中嵴上皮细胞,证实了腭中嵴上皮细胞可转化为间充质细胞。Carette等^[8]以角蛋白标记配对技术对胚胎腭突上皮的正常转归进行了研究,结果也证明中嵴上皮细胞转化为间充质细胞,腭突鼻腔面上皮转化为假复层纤毛柱状上皮,而腭突口腔面上皮转化为复层扁平上皮。Jin等^[9]建立了嵌合体培养系统,观察到腭中嵴上皮细胞迁移到腭突鼻腔面而不是口腔面,原位杂交实验证明腭突融合期间发生上皮—间充质转化。而Apaf1基因突变小鼠模型显示胚胎的腭中嵴上皮细胞不发生细胞凋亡也可以完成双侧腭突融合^[10]。本实验中,对照组与12 d给药组小鼠腭中嵴上皮细胞中TUNEL阳性细胞率虽无显著性差异,但12 d给药组小鼠中嵴上皮带的相对完整,提示维甲酸可能影响了腭中嵴上皮细胞的上皮间充质转化和迁移等其他转归形式。

综上所述,维甲酸在胚胎形成过程中能够调控形态发生、细胞增殖、分化,同时还具有很高的致

畸性,并与腭裂形成密切相关。维甲酸作用于腭突发生不同时期产生的腭裂形式不同:作用于腭突发生前期,诱导腭间充质细胞增殖抑制、凋亡过度,最终导致双侧腭突形态发育障碍、接触失败而发生腭裂;作用于腭突垂直生长期,未影响腭间充质细胞及腭中嵴上皮细胞细胞增殖、凋亡水平,而可能影响了腭中嵴上皮细胞除凋亡以外的其他转归形式,双侧腭突形态正常,虽发生接触,但融合失败。总而言之,腭间充质细胞和腭中嵴上皮细胞的细胞增殖和细胞凋亡的异常都与腭突发育及腭裂发生密切相关。

[参考文献]

- [1] Lai L, Bohnsack BL, Niederreither K, et al. Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis[J]. *Development*, 2003, 130(26): 6465-6474.
- [2] Suwa F, Jin Y, Lu H, et al. Alteration of apoptosis in cleft palate formation and ectomesenchymal stem cells influenced by retinoic acid[J]. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 2001, 78(5): 179-186.
- [3] 李鑫, 金岩, 董绍忠, 等. 程序性细胞死亡在小鼠腭突发育及腭裂形成中的意义[J]. *华西口腔医学杂志*, 1999, 17(4): 318-320.
LI Xin, JIN Yan, DONG Shao-zhong, et al. Significance of programmed cell death in C57BL/6N strain mouse palate process development and cleft palate formation[J]. *West China J Stomatology*, 1999, 17(4): 318-320.
- [4] Taniguchi K, Sato N, Uchiyama Y. Apoptosis and heterophagy of medial edge epithelial cells of the secondary palatine shelves during fusion[J]. *Arch Histol Cytol*, 1995, 58(2): 191-203.
- [5] Mori C, Nakamura N, Okamoto Y, et al. Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labelling of DNA fragmentation[J]. *Anat Embryol(Berl)*, 1994, 190(1): 21-28.
- [6] Martínez-Alvarez C, Tudela C, Pérez-Miguelsanz J, et al. Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion[J]. *Dev Biol*, 2000, 220(2): 343-357.
- [7] Shuler CF, Guo Y, Majumder A, et al. Molecular and morphologic changes during the epithelial-mesenchymal transformation of palatal shelf medial edge epithelium *in vitro*[J]. *Int J Dev Biol*, 1991, 35(4): 463-472.
- [8] Carette MJ, Lane EB, Ferguson MW. Differentiation of mouse embryonic palatal epithelium in culture: Selective cytokeratin expression distinguishes between oral, medial edge and nasal epithelial cells[J]. *Differentiation*, 1991, 47(3): 149-161.
- [9] Jin JZ, Ding J. Analysis of cell migration, transdifferentiation and apoptosis during mouse secondary palate fusion[J]. *Development*, 2006, 133(17): 3341-3347.
- [10] Maden M, Graham A, Gale E, et al. Positional apoptosis during vertebrate CNS development in the absence of endogenous retinoids[J]. *Development*, 1997, 124(14): 2799-2805.