

[文章编号 1000-1182(2005)02-0103-03]

## 地塞米松对体外培养 A 系小鼠腭突 腭中嵴上皮融合的影响

黄 磊<sup>1</sup>, 石 冰<sup>2</sup>, 孙晋虎<sup>3</sup>, 王 雯<sup>2</sup>

(1. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学;

2. 四川大学华西口腔医学院 口腔颌面外科学教研室, 四川 成都 610041;

3. 广西医科大学口腔医院 口腔颌面外科, 广西 南宁 530021)

[摘要] 目的 研究在腭间充质存在的情况下, 地塞米松对腭中嵴上皮细胞分化、转归的影响, 以探讨地塞米松引起腭裂畸形的发病机制。方法 A 系小鼠妊娠 14 d 8 h 在体视显微镜下, 解剖分离出 A 系小鼠胚胎腭突, 应用半浸静式腭突体外培养方法, 通过光学显微镜和透射电镜观察在腭突接触融合时, 地塞米松对腭中嵴上皮细胞的影响。结果 地塞米松促进了腭中嵴上皮分化成复层鳞状上皮, 加速了腭间充质分化过程, 影响了腭突的正常发育, 阻碍腭突融合。结论 地塞米松可能通过加速腭间充质分化和抑制腭中嵴上皮正常转归的双重作用, 阻碍腭的正常发育过程, 导致腭裂畸形。

[关键词] 腭裂; 腭突; 地塞米松

[中图分类号] R 782.2 [文献标识码] A

**Influence of Dexamethasone on Fusion of Embryonic Palatal Medial Edge Epithelium in Mouse Palatal Shelves** *in vitro*

HUANG Lei<sup>1</sup>, SHI Bing<sup>2</sup>, SUN Jin-hu<sup>3</sup>, WANG Yan<sup>2</sup>. (1. Key Lab. of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract Objective** To study the effect of dexamethasone on the differentiation and proliferation of type A mouse palatal medial edge epithelial cells when there is type A mouse embryonic palatal mesenchymal cells. **Methods** The mouse palatal shelves were harvested from a female mouse of gestation day 14 by microsurgical dissection and cultured *in vitro*. The differentiation was investigated through microscope and transmission electron microscope under condition of the palatal shelves fusion. **Results** Dexamethasone promoted the palatal medial edge epithelium differentiated into squamous epithelium and affected normal development and obstructed the fusion of mouse palatal shelves. **Conclusion** The results of histological observation indicate that dexamethasone promotes the proliferation of palatal mesenchymal cells and inhibits the normal differentiation of palatal medial edge epithelial cells, which results in cleft palate.

**Key words** cleft palate; palatal shelves; dexamethasone

在腭间充质存在的情况下, 研究致畸剂对腭中嵴上皮细胞分化、转归的影响, 能更好地反映体内腭突融合的情况。本研究采用半浸静式腭突体外培养方法, 观察地塞米松对腭突接触融合时腭中嵴上皮细胞的影响, 探讨地塞米松在腭发育过程中的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物

成年 A 系小鼠 (The Jackson Laboratory 提供) 12

只, 年龄 80 ~ 100 d, 保持 12 h 昼夜周期制, 室温控制在 20 ~ 25 ℃, 充足食物, 自由饮水 (pH 5)。按雌雄比例 2 : 1 于当晚 8 点到次日晨 8 点合笼, 并于次日晨 8 点检查雌鼠, 有阴道栓者为交配阳性, 定此日为妊娠 0 d, 同日晚 8 点记录体重。于 10 d 后晚 8 点测体重, 发现小鼠体重显著增长者为妊娠阳性, 体重无显著增长者为妊娠阴性, 重新合笼。

#### 1.2 胚胎获取及腭突分离

在孕期 14 d 8 h (GD14<sup>8</sup> d) 时, 即在体内腭突接触及融合前约 18 h 无菌条件下, 取出 A 系小鼠胚胎, 切取鼠胚胎头部, 将其置于 pH 7.2 的 GME-PBS 液 ( $\text{Ca}^{2+}$  &  $\text{Mg}^{2+}$ -free-phosphate buffered solution) 中, 体视显微镜放大 12 倍下, 用显微外科剪解离出腭突, 放置在

[收稿日期 2004-10-08; 修回日期 2004-12-20]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30171020)

[作者简介] 黄 磊 (1970-), 男, 黑龙江人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 石 冰, Tel: 028-85501521

GMF-PBS 液中备用。

### 1.3 半浸静式体外培养腭突

将 2 % 琼脂 (Promega 公司, USA) 与 2 倍稀释的 DMEM/F-12 (dulbecco minimum essential medium/ ham F-12 medium) 培养基混匀, 倒入培养皿中, 使其厚度达培养皿的 2/3 高度, 制成固态琼脂 DMEM/F-12 培养基, 并用手术刀刻成琼脂培养基小岛。将已解离的 12 对腭突按正常体内的状况成对排列在琼脂岛上, 随机分为实验组和对照组各 6 对, 两组腭突分置于不同培养皿中。培养液均为 DMEM/F-12, 内含 10 % 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素每毫升 100 单位、链霉素 0.1 g/L。仅在实验组加入终浓度为 20 ng/ml 的地塞米松。两组培养皿中注入培养液, 令其液面与琼脂小岛表面高度相同。盖上培养皿, 放入培养箱, 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 饱和湿度下培养。培养 24 h、72 h 后取出培养的腭突备用。

### 1.4 光镜及电镜标本的制作

将培养的腭突放入 4 % 多聚甲醛溶液中固定 12 h 后, 流水冲洗, 逐级脱水、透明、浸蜡、包埋, 制成 4 μm 厚组织切片, 中性树脂封片, 用于光镜下观察。将培养的腭突先后放入 2.5 % 戊二醛溶液、1 % 锇酸固定后, 乙醇逐级脱水, 环氧树脂 618 包埋液浸透包埋, 超薄切片, 醋酸铅及枸橼酸铅染色后电镜观察。

## 2 结果

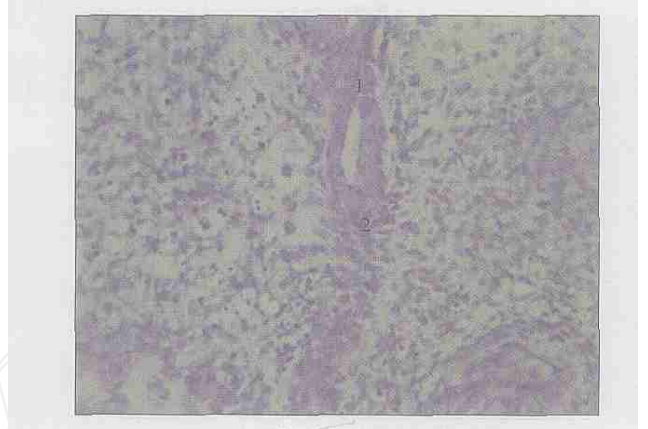
### 2.1 光学显微镜观察

腭突培养 24 h 后, 对照组两侧腭突中嵴上皮完全接触, 中嵴上皮变薄, 部分区域上皮条索连续性中断, 两侧腭突间充质细胞相连 (图 1)。实验组腭突两侧腭中嵴上皮接触, 但未见腭中嵴上皮变薄, 且由其组成的上皮条索连续性完好, 基底膜清晰, 两侧腭突没有间充质相贯通 (图 2)。腭突培养 72 h 后, 对照组腭突结合后上皮条索消失, 由间充质细胞充满, 腭突口腔面上皮钙化为复层鳞状上皮, 在腭突间充质区还可见少量软骨细胞 (图 3)。实验组两侧腭突接触区腭中嵴上皮增厚, 由其形成的上皮条索完整, 基底膜清晰, 同时可见腭突内出现较多软骨样细胞 (图 4)。

### 2.2 透射电镜观察

对照组腭突培养 24 h 后, 在上皮条索崩解区上皮细胞减少, 出现溶酶体, 胞质核比例减少。上皮细胞中的线粒体形状多样, 有球形、不规则形等。在部分上皮条索周围基底膜丧失, 间充质细胞伸出伪足进入基底膜, 电子致密细胞存在, 上皮及间充质细胞内有丰富的胶原和粗面内质网 (图 5)。实验组腭突培养 24 h 后上皮与间充质明显可分, 基底膜清晰。上皮细胞胞质核比例增加, 桥粒及张力丝增多。邻近表面的细胞外间隙扩张, 细胞质中游离核糖体增

多, 线粒体正常, 未见电子致密细胞 (图 6)。



1: 上皮条索; 2: 上皮条索崩解  
图 1 对照组腭突培养 24 h 后部分上皮条索崩解 HE ×200  
Fig 1 24 hours after control palatal shelves culture showed partial epithelium seam disintegration HE ×200

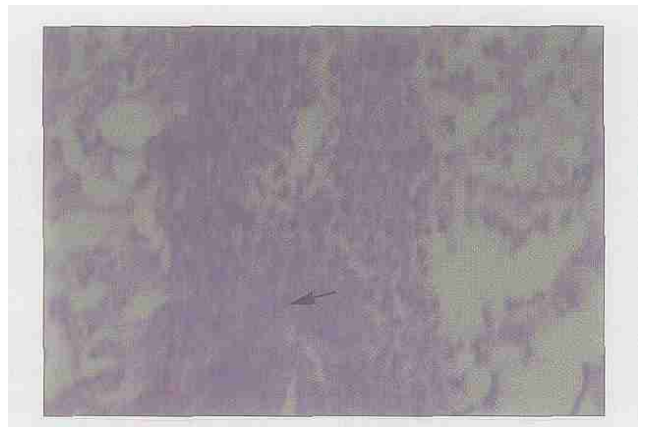


图 2 实验组腭突培养 24 h 后上皮条索连续性完好 HE ×200  
Fig 2 24 hours after experimental palatal shelves showed media edge epithelium seam integrity HE ×200

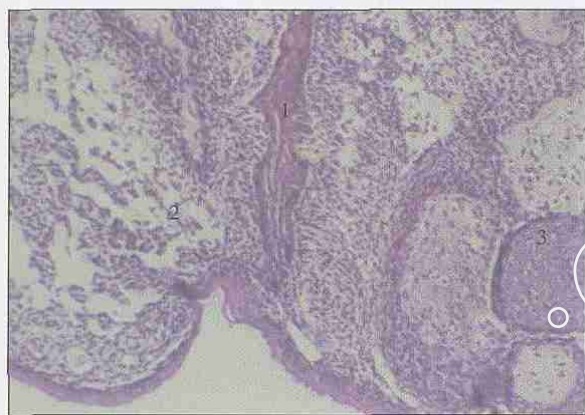


图 3 对照组腭突培养 72 h 后两腭突融合 HE ×200  
Fig 3 72 hours after control palatal shelves culture showed palatal shelves fusion HE ×200

## 3 讨论

单纯的腭间充质细胞或上皮细胞培养以及腭细胞联合培养方法, 与具有立体结构和功能的胚胎腭突

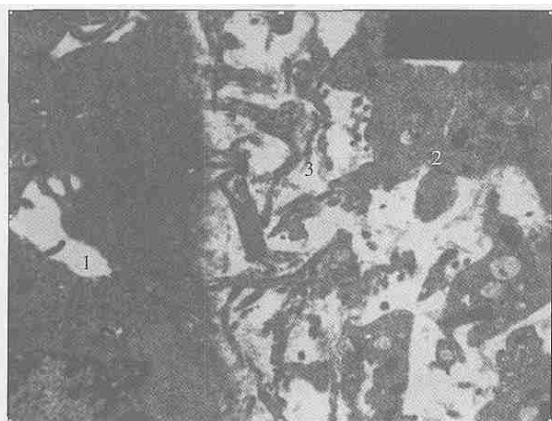
器官存在着显著差异。体外培养腭突的融合过程与体内腭突发育过程无论在宏观上还是在组织学上都很相似<sup>1,2</sup>,本研究采用半浸静式腭突体外培养的方法正是利用了此优点。



1:上皮条索; 2:腭突; 3:软骨样细胞

图 4 实验组腭突培养 72 h 后中嵴上皮条索中出现软骨样细胞 HE ×100

Fig 4 72 hours after experimental palatal shelves showed media edge epithelium seam with chondroid cell HE ×100



1:腭突上皮; 2:腭突间充质; 3:细胞伪足

图 5 对照组腭突培养 24 h 后上皮基底膜崩解 TEM ×1800

Fig 5 24 hours after control palatal shelves culture showed basal membrane disintegration TEM ×1800



1:上皮; 2:间充质; 3:基底膜

图 6 实验组腭突培养 24 h 后上皮基底膜清晰 TEM ×6000

Fig 6 24 hours after experimental palatal shelves treated with DEX showed basal membrane clear TEM ×6000

糖皮质激素类物质可引起腭发育畸形已众所公认,但其致畸机制尚不清楚。石冰等<sup>3,4</sup>发现地塞米松可通过影响腭细胞表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及转化生长因子<sub>1</sub>(transforming growth factor<sub>1</sub>, TGF<sub>1</sub>)基因表达及糖皮质激素信号传递途径中的功能活性物质膜联蛋白(Annexin)、胞浆磷脂酶 A<sub>2</sub>(cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>)和前列腺素(prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)的合成而改变腭细胞正常的增殖代谢及分化。为研究地塞米松对腭中嵴上皮区域性分化的影响,本研究将 A 系小鼠 CD 14 d 8 h 胚胎腭突在体视显微镜(放大 12 倍)下用显微外科剪解离出来,利用半浸静式琼脂小岛器官培养技术,进行了腭突体外培养的研究。结果表明,在含有 10 % FBS 的 DMEM/F-12 培养基中,培养的腭突能较好地继续发育,在培养 24 h 后可见部分上皮条索和基底膜崩解,间充质细胞长入崩解的基底膜及上皮条索中。电镜显示间充质细胞长出突起伸向基底膜及上皮条索中,同时发现上皮细胞在形态和结构上向间充质细胞转化,而地塞米松促进了中嵴上皮分化成复层鳞状上皮,阻止了上皮条索的崩解,导致两侧腭突间充质不能融合。本研究发现,地塞米松使腭间充质内形成较多的软骨样细胞,这可能是由于地塞米松促进了腭间充质细胞分化引起的。研究表明,在小鼠腭突发育过程中给予大剂量的地塞米松,可抑制腭突生长并导致腭裂,这可能是因为地塞米松作用于腭突后,一方面通过影响腭突细胞中 Annexin 和 cPLA<sub>2</sub> 的合成而干扰 PGE<sub>2</sub> 的作用,从而影响了细胞的正常代谢功能<sup>4</sup>。另一方面地塞米松促进了腭突细胞 EGF、TGF<sub>1</sub> 基因表达,加速了腭间充质细胞及腭上皮细胞的分化,引起腭中嵴上皮分化成复合鳞状上皮,使两侧腭突抬起后相接触形成的上皮条索不能崩解,两腭突间充质不能接触融合,最终导致腭裂畸形发生。

## [参考文献]

- 1] Hassell JR. The development of rat palatal shelves *in vitro*. An ultrastructural analysis of the inhibition of epithelial cell death and palate fusion by the epidermal growth factor J. Dev Biol, 1975, 45(1):90-102.
- 2] Bulleit RF, Zimmerman EF. The influence of the epithelium on palate shelf reorientation J. J Embryol Exp Morphol, 1985, 88(8):265-279.
- 3] 石冰,孙晋虎,王大章,等. 地塞米松和 VitB<sub>12</sub>对 A 系小鼠胚胎腭突细胞生长因子基因表达的影响 J. 四川大学学报(医学版), 2003, 34(1):27-29.
- 4] 石冰,左晖,毛祖彝. 地塞米松诱发小鼠腭裂时 Annexin I、cPLA<sub>2</sub> 和 PCNA 表达的研究 J. 中华口腔医学杂志, 2003, 38(3):188-191.

(本文编辑 王 晴)