

维甲酸诱导腭裂相关wnt和成纤维细胞生长因子配体表达的动态变化

沈璐¹ 丛蔚¹ 王如² 肖晶¹

(1.大连医科大学口腔医学院 口腔基础教研室, 大连 116044;

2.大连医科大学附属第一医院 口腔科, 大连 116011)

[摘要] 目的 筛选与维甲酸诱导腭裂相关的wnt和成纤维细胞生长因子(FGF)信号分子, 观察其在正常腭突发育和维甲酸诱导腭裂形成不同阶段的表达动态变化。方法 建立维甲酸诱导腭裂小鼠模型, 制作基因芯片并筛选wnt和FGF信号通路相关基因。根据芯片结果选出wnt经典通路配体wnt3和wnt8a、FGF通路配体fgf9和fgf10, 并应用半定量逆转录-PCR(RT-PCR)技术检测其在胚胎天数(ED)13.5~15.5中表达变化。结果 1)ED14.5实验组腭突组织芯片分析结果显示: wnt3和fgf10表达水平上调, wnt8a和fgf9表达水平下降。2)在ED13.5~15.5正常对照组腭突发育的不同阶段, 上述基因呈现持续性高表达, 表达水平呈动态变化。3)在ED13.5~15.5的实验组腭裂发生的不同阶段, 上述基因的表达水平与正常对照组均有差异($P<0.05$)。结论 wnt和FGF信号分子通路参与小鼠胚胎继发腭的正常发育过程, 在维甲酸诱导的腭裂发生过程中, 存在维甲酸通路与wnt和FGF通路的相互作用。

[关键词] 腭裂; 动物模型; 信号分子; 基因筛选

[中图分类号] R 782.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.01.015

Dynamic expression of wnt and fibroblast growth factor ligands in cleft palate induced by retinoic acid
SHEN Lu¹, CONG Wei¹, WANG Ru², XIAO Jing¹. (1. Dept. of Oral Biology, College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China)

[Abstract] **Objective** To screen the wnt and fibroblast growth factor(FGF) ligands involved in palatogenesis and cleft palate, and to study the dynamic expression of them in the different stages of palatal development and cleft palate formation. **Methods** Mouse model of retinoic acid(RA)-induced cleft palate was set up. At embryo day(ED) 14.5, the palatal tissues of RA-treated group and wild type were collected and prepared for gene-chip analysis. According to the gene-chip results, wnt3, wnt8a, fgf9 and fgf10 were selected and their expression level was detected at ED13.5-15.5 by using semi-quantitative reverse transcription-PCR(RT-PCR). **Results** 1)Gene-chip analysis showed that in RA-induced cleft palate group wnt8a and fgf9 were down-regulated, wnt3 and fgf10 were up-regulated in conversely. 2)During the different stage of the control group palatogenesis, intense expression of wnt3, wnt8a, fgf9 and fgf10 were detected with a continuous dynamic pattern. 3)Compared with the control group, the expression level of wnt3, wnt8a, fgf9 and fgf10 in RA-induced cleft palate showed significant difference, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** wnt and FGF signaling molecules participate in the palatogenesis, and RA pathway may interact with wnt and FGF signaling pathway.

[Key words] cleft palate; animal model; signaling pathway; gene screen

先天性唇腭裂是通过基因与环境因素交互作用造成的多基因易感性疾病。维甲酸(retinoic acid, RA)是维生素A的衍生物, 被广泛应用于化疗药物、皮肤病的治疗药物以及化妆品的添加剂中, 是新生

儿发生唇腭裂的常见环境因素之一, 而维甲酸致畸作用是通过基因调控达成的。维甲酸与其膜受体结合, 经细胞浆内的维甲酸结合蛋白运输到核内, 最终通过基因转录调控来实现的, SHH等信号分子通路中的重要基因都被证明参与到维甲酸致腭裂的过程^[1]。

wnt信号分子家族调控着胚胎多种组织的发育过程, 包括细胞命运的转化、细胞增殖、细胞极性

[收稿日期] 2010-04-10; [修回日期] 2010-06-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30871352和30973349)

[作者简介] 沈璐(1983—), 女, 辽宁人, 硕士

[通讯作者] 肖晶, Tel: 0411-86110400

细胞迁移。wnt/ β -Catenin通路又被称为wnt经典通路,由wnt1、wnt3a和wnt8等配体激活,主要通过稳定核内 β -Catenin而活化目的基因,是目前研究最多的wnt通路^[2]。成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)和其受体组成了庞大而复杂的信号分子家族,在进化中高度保守,在颌面部神经嵴细胞的迁移、存活和增殖,上皮间充质相互作用及模式发育中起着重要作用^[3]。目前研究证明wnt和FGF信号分子通路直接调控正常腭的发育过程,但在维甲酸诱导的小鼠腭裂发生过程中的动态表达变化尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级ICR小鼠,雄鼠20只,雌鼠40只,由大连医科大学SPF实验动物中心提供。

1.2 实验用药

全反式维甲酸(Sigma公司,美国),基因表达谱芯片(Affymetrix公司,美国),TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver.3.0试剂盒(日本宝生物公司),引物合成订于上海英骏生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠腭裂模型的建立 选取10周龄左右SPF级ICR小鼠,按雌雄比例2:1合笼,阴栓阳性的雌鼠记为胚胎0 d(embryo day 0, ED0)。于ED10,按照

100 mg·kg⁻¹体重对孕鼠进行维甲酸灌胃,对照组孕鼠给予植物油作为对照^[4]。分别于ED13.5、14、14.5、15、15.5脱颈处死孕鼠,剖宫取出胚鼠。获得孕鼠总数为30只,对照组及实验组各15只,对照组获取胚鼠总数为164只,实验组获取胚鼠总数为181只。

1.3.2 基因芯片组织收集及数据处理 在体视显微镜下,使用DEPC处理过的器皿,分离ED14.5对照组及实验组胚鼠的腭突组织,置于Trizol中,液氮速冻,组织收集完毕后送至上海生物芯片有限公司进行基因芯片制作。芯片数据结果以Signal Log Ratio ≥ 1 或 ≤ -1 ,即实验组表达水平较正常对照组上调或下调2倍以上,作为筛选差异表达基因的标准。

1.3.3 半定量逆转录-PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)实验 提取ED13.5~15.5胚鼠腭突组织总RNA,反转录合成cDNA。设计wnt3、wnt8a、fgf9、fgf10基因和内参GAPDH的引物用于扩增(表1)。GAPDH的反应条件为94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 30 s, 24个循环;wnt3和wnt8a反应条件为94℃ 45 s, 59℃ 45 s, 72℃ 1 min, 35个循环;fgf9和fgf10反应条件为94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环。2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物目的片段,UV凝胶成像体系观察并拍摄结果, Vision Works LS软件测定条带灰度值,利用SPSS 10.0软件对数据进行统计学分析,采用秩和检验比较组间表达差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表 1 引物序列及反应条件

Tab 1 Primer set and condition

引物	编号	序列(5'-3')	片段/bp	循环温度/℃
wnt3	NM_009521	TCGCTGGCTACCCAATTTC TTCGGCCTGCTTCATTGTT	518	66~35
wnt8a	NM_009290	TGTCATGGCATCTCAGGAAG GCGGTTGCAGTACTCAGGAG	240	72~35
fgf9	NM_013518	ACTCTACCTCGGCATGA TCCTGGTCCCTTCTCTTG	194	65~35
fgf10	NM_008002.3	CACATTGTGCCTCAGCCTTTCC CCTGCCATTGTGCTGCCAGTTAA	506	73~35
GAPDH	AK002273	ATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC GTCTTCTGGGTGCCAGTGATG	554	72~24

2 结果

2.1 组织学变化

正常对照组ICR小鼠的ED13.5~14为腭突的垂直生长期,ED14~15为腭突上抬后的水平生长期,自ED15腭突发生接触,腭中嵴上皮融合形成上皮带,至ED15.5腭中嵴上皮细胞消失,双侧腭突完全融合。实验组腭裂的发生率为100%,在ED14~15.5,双侧腭突呈水平向,但是因腭突较短小,未发生接

触融合而形成完全性腭裂。

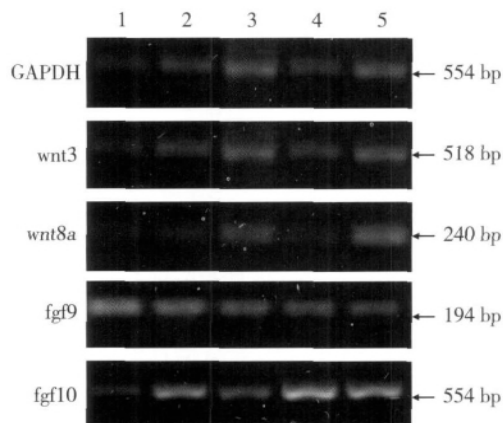
2.2 芯片分析结果

在ED14.5实验组和对照组腭突组织芯片分析结果中,选取了wnt和FGF信号分子家族表达变化显著的4个配体,其中wnt3和fgf10在实验组中表达水平上调,wnt8a和fgf9在实验组中表达水平下降。

2.3 半定量RT-PCR结果

在ED13.5~15.5的对照组正常腭突发育的不同阶段,wnt3、wnt8a、fgf9和fgf10呈现持续性高表达,

表达水平呈动态变化(图1)。变化趋势如下: 1)wnt3在垂直生长期表达水平呈上升趋势,进入水平生长期呈下降趋势,至双侧腭突接触时,表达水平降至最低,在接触融合期表达又呈上升趋势; 2)wnt8a在垂直生长期表达水平呈下降趋势,进入水平生长期呈先上升后下降的波动,至双侧腭突接触时,表达水平降至最低,在接触融合期表达又呈上升趋势; 3)fgf9表达水平随着腭突发育呈持续性下降,在垂直生长期和接触融合期下降陡度最大; 4)fgf10在垂直生长期表达水平呈上升趋势,进入水平生长期呈先下降后上升的波动,至双侧腭突接触时,表达水平升至最高,在接触融合期表达又呈下降趋势。

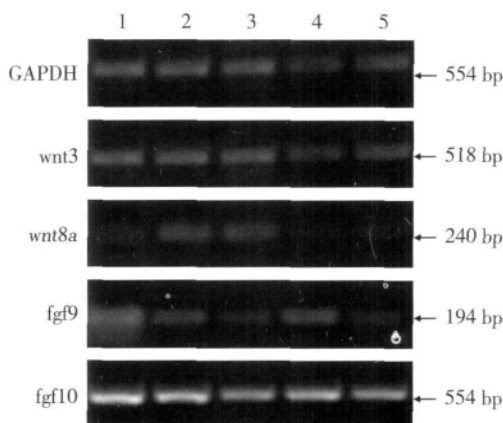


1~5依次为ED13.5、ED14、ED14.5、ED15、ED15.5。

图1 对照组不同阶段的RT-PCR产物电泳图

Fig 1 Electrophoresis figure of RT-PCR products for wild type in different stages

在ED13.5~15.5的实验组腭裂发生的不同阶段, wnt3、wnt8a、fgf9和fgf10的表达水平与正常对照组均有差异,结果具有统计学意义($P < 0.05$)(图2、3)。变化趋势如下: 1)wnt3在腭突的发育全过程中,均高于正常对照; 2)wnt8a在垂直生长期表达水平快速下降后,维持低水平表达,在腭突的发育全过程中,均低于正常对照; 3)fgf9在生长早期表现为与对照组相似的持续性下降趋势,表达水平低于对照组;但在水平生长后期出现异常的高表达,在接触融合期表现为与对照组相似的趋势; 4)fgf10在腭突的发育全过程中与对照组表达趋势一致,表达水平均高于正常对照。



1~5依次为ED13.5、ED14、ED14.5、ED15、ED15.5。

图2 实验组不同阶段的RT-PCR产物电泳图

Fig 2 Electrophoresis figure of RT-PCR products for RA-treated group in different stages

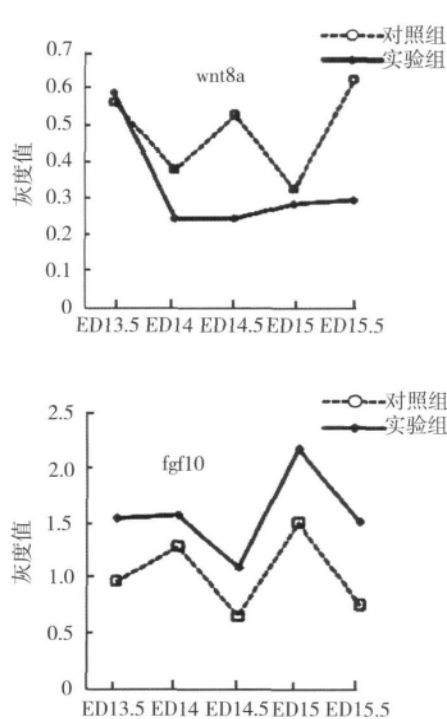
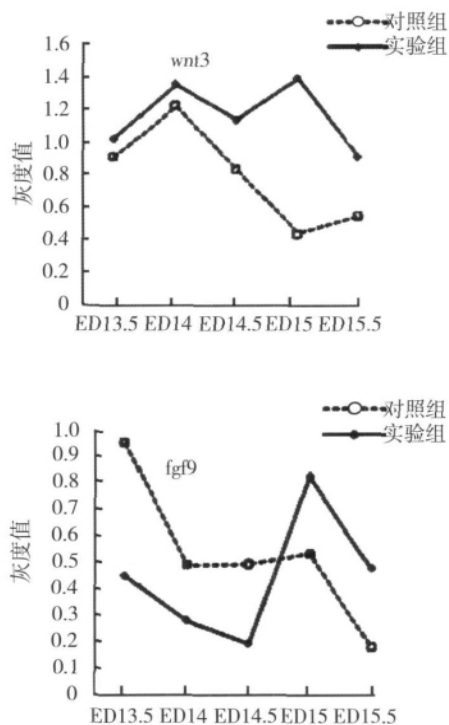


图3 wnt3、wnt8a、fgf9和fgf10在腭突发育过程中的表达趋势

Fig 3 The expression level of wnt3, wnt8a, fgf9 and fgf10 in the palatogenesis

3 讨论

在人类胚胎发育中, *wnt3*基因表达缺失会导致胎儿四肢缺失、颅面部畸形及唇腭裂发生^[4]。*wnt3*主要参与胚胎体轴的形成, *wnt3*基因敲除小鼠胚胎出现四肢缺失, 在颌面部发育早期*wnt3*即特异性出现在中鼻突末端及上下颌突的外胚层^[5]。在本研究中, *wnt3*在正常小鼠腭突发育中呈持续高表达, 证明了*wnt3*可能直接参与腭突发育, *wnt3*在腭间充质细胞快速增殖的垂直生长期表达水平呈上升趋势, 提示了*wnt3*可能与腭间充质细胞增殖和腭延伸相关, 这与*wnt3*基因敲除小鼠影响胚胎早期体轴的延伸相吻合。2010年Koop等^[6]在对脊椎动物原肠胚期维甲酸通路的靶基因筛选过程中发现: *wnt3*是维甲酸通路的间接受体, 维甲酸高表达可直接上调*wnt3*的表达水平。在本研究中, *wnt3*在维甲酸致腭裂组的各个阶段的表达均高于正常对照组, 证实了在维甲酸诱导腭裂发生过程中, *wnt3*同样是维甲酸通路的间接受体, 并可直接参与腭裂的形成。

维甲酸-合成酶视黄醛脱氢酶2(RA-synthesizing enzyme retinaldehyde dehydrogenase 2, *Raldh 2*)功能是调控维甲酸的合成, *Raldh 2*基因敲除鼠胚表现为维甲酸产生不足及维生素A严重缺乏。研究^[7]发现: *wnt8a*在*Raldh 2*基因敲除鼠胚的体轴发育中发生异位表达, 且表达水平下调。虽然*wnt8a*基因敲除小鼠没有观察到明显的腭发育异常^[8], 但本研究结果表明*wnt8a*在正常腭发育过程中呈波动性高表达, 在RA诱导的腭裂小鼠腭突中*wnt8a*基因表达明显下调, 提示作为*wnt/β-Catenin*经典通路配体的*wnt8a*可能参与了维甲酸诱导的腭裂发生。

*fgf9*与*fgf10*虽分属FGF家族的不同亚族, 但在小鼠胚胎颌面部发育早期, *fgf9*与*fgf10*重叠表达于鼻突及面中部^[9]。*fgf10*在腭突发育早期表达在邻近正中嵴和口腔面上皮下方的间充质中, *fgf10*基因敲除后胚胎发生明显的腭裂, 表现为腭突上层薄且有明显的抑制, 表明了*fgf10*在腭早期发育中具有调控细胞增殖和细胞存活的功能^[10]。实验组中*fgf10*的表达水平在腭突发育各阶段均高于对照组, 说明了RA通路可上调*fgf10*的表达水平。*fgf9*与腭裂发生相关的研究未见报道, 但*fgf9*在ED14.5腭皱襞基板的上皮中有微弱的表达^[11], *fgf9*基因敲除小鼠肺发育研究证明了*fgf9*是调节*fgf10*表达水平的调节器^[12]。在本研究维甲酸诱导腭裂组中, *fgf9*的表达水平在腭突上皮间充质相互作用的关键时期出现异常的波动, 上调至最高峰; *fgf10*与*fgf9*在同一时间点表达水平上

调至最高峰, 提示了*fgf9*和*fgf10*在维甲酸诱导腭裂过程中也存在着调控作用。

综上所述, 在正常腭突发育的不同阶段, *wnt3*、*wnt8a*、*fgf9*和*fgf10*呈现持续性动态高表达, 表明上述信号分子直接参与腭的发育。而在维甲酸诱导腭裂发生的不同阶段, *wnt3*、*wnt8a*、*fgf9*和*fgf10*的异常表达, 提示维甲酸通路与*wnt*和FGF信号分子通路存在着相互作用。

【参考文献】

- [1] 王如, 刘彬, 王博, 等. 腭发育不同时期维甲酸对腭突细胞增殖和凋亡的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2008, 26(5): 546-549.
WANG Ru, LIU Bin, WANG Bo, et al. Spatial and temporal changes of palatal cell proliferation and cell apoptosis of retinoic acid induced mouse cleft palate in different embryonic stages[J]. West China J Stomatol, 2008, 26(5): 546-549.
- [2] van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development[J]. Development, 2009, 136(19): 3205-3214.
- [3] Nie X, Luukko K, Kettunen P. FGF signalling in craniofacial development and developmental disorders[J]. Oral Dis, 2006, 12(2): 102-111.
- [4] Niemann S, Zhao C, Pascu F, et al. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family[J]. Am J Hum Genet, 2004, 74(3): 558-563.
- [5] Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, et al. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation[J]. Nat Genet, 1999, 22(4): 361-365.
- [6] Koop D, Holland ND, Sémon M, et al. Retinoic acid signaling targets Hox genes during the amphioxus gastrula stage: Insights into early anterior-posterior patterning of the chordate body plan[J]. Dev Biol, 2010, 338(1): 98-106.
- [7] Zhao X, Duester G. Effect of retinoic acid signaling on Wnt/β-catenin and FGF signaling during body axis extension[J]. Gene Expr Patterns, 2009, 9(6): 430-435.
- [8] van Amerongen R, Berns A. Knockout mouse models to study Wnt signal transduction[J]. Trends Genet, 2006, 22(12): 678-689.
- [9] Bachler M, Neubüser A. Expression of members of the Fgf family and their receptors during midfacial development[J]. Mech Dev, 2001, 100(2): 313-316.
- [10] Rice R, Spencer-Dene B, Connor EC, et al. Disruption of Fgf10/Fgfr2b-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate[J]. J Clin Invest, 2004, 113(12): 1692-1700.
- [11] Pornaveetus T, Oommen S, Sharpe PT, et al. Expression of Fgf signalling pathway related genes during palatal rugae development in the mouse[J]. Gene Expr Patterns, 2010, 10(4/5): 193-198.
- [12] Colvin JS, White AC, Pratt SJ, et al. Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme[J]. Development, 2001, 128(11): 2095-2106.

(本文编辑 汤亚玲)