

腭裂小鼠牙胚发育中 β -连环蛋白的表达***

王利婷¹, 宋容¹, 王莎¹, 司庆宗¹, 张瑞¹, 王建林², 赵望泓³

¹兰州大学口腔医学院, 甘肃省兰州市 730000; ²兰州大学生命科学学院, 甘肃省兰州市 730000; ³南方医科大学南方医院口腔医疗中心, 广东省广州市 510515

王利婷★, 女, 1982年生, 河南省洛阳市人, 汉族, 兰州大学口腔医学院在读硕士, 主要从事口腔发育生物学的研究。
wanglit09@lzu.edu.cn

通讯作者: 王建林, 博士, 教授, 兰州大学生命科学学院, 甘肃省兰州市 730000
jlwang@lzu.edu.cn

通讯作者: 赵望泓, 博士, 教授, 兰州大学口腔医学院, 现工作单位为南方医科大学南方医院口腔医疗中心, 广东省广州市 510515
haowh@lzu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)50-09344-05

收稿日期: 2012-04-13
修回日期: 2012-08-29
(20120216001/N·W)

文章亮点: 选题紧密结合牙齿发育生物学中信号传导的热点问题, 通过苏木精-伊红染色和免疫组化技术, 探讨维甲酸在诱导小鼠腭裂发生过程中牙胚发育的形态学变化及 β -连环蛋白在牙胚发育中的表达变化, 有助于深刻认识 β -连环蛋白在牙胚发育及细胞分化中的作用, 为该领域的研究提供理论依据。

关键词: 腭裂; β -连环蛋白; 维甲酸; 牙胚; 组织发育; 免疫组织化学; 小鼠; 苏木精-伊红染色; 动物模型; 组织构建

摘要

背景: 牙齿发育生物学中信号传导是热点问题, β -连环蛋白是 Wnt 信号传导通路中的关键效应因子, 其在发育的牙胚中有普遍表达, 并且在内釉上皮、釉结、星网状层、中间层的表达有时空变化。

目的: 通过苏木精-伊红染色和免疫组化技术, 观察牙胚在维甲酸诱导腭裂发生中的形态学变化及 β -连环蛋白的表达变化。

方法: 选取 C57BL/6J 近交系小鼠, 按雌雄比 2:1 于晚 8 时合笼, 次日 8 时检查雌鼠, 发现阴栓视为妊娠, 定为 E0 d。18 只孕鼠随机分为 3 组: 在 E10 d, 实验组以维甲酸 100 mg/kg 对孕鼠行一次性灌胃, 制备腭裂动物模型; 植物油对照组给予 10 mL/kg 橄榄油灌胃; 空白对照组不做任何处理。

结果与结论: β -连环蛋白在空白对照组 E13 d 牙胚蕾状期、E14 d 帽状期、E16 d 钟状期上皮内均有表达, 且空白对照组的表达随着牙胚发育的成熟而逐渐增加, 实验组的变化趋势与空白对照组相同。3 个时期的实验组 β -连环蛋白在牙胚中的表达水平均高于空白对照组, 植物油对照组和空白对照组表达无明显差异。提示维甲酸在诱导腭裂发生过程中, 可能通过干扰上皮-间充质间的相互作用, 上调 β -连环蛋白在牙胚中的表达, 使牙胚发育受阻。

Expression of beta-catenin in tooth germ development of mice with cleft palate

Wang Li-ting¹, Song Rong¹, Wang Sha¹, Si Qing-zong¹, Zhang Rui¹, Wang Jian-lin², Zhao Wang-hong³

Abstract

BACKGROUND: In the biological study of dental development, signal transduction is a hot issue, and β -catenin is the key effector of the Wnt signaling pathway. β -catenin expresses in the tooth germ development and shows a temporal changes in the expression in the inner enamel epithelium, enamel knot, stellate reticulum, and intermediate layer.

OBJECTIVE: To investigate the morphologic changes of tooth germ development during cleft palate induced by all-trans retinoic acid in C57BL/6J mice, and to detect the effect of excess all-trans retinoic acid on the expression of β -catenin in tooth germ development.

METHODS: Eighteen pregnant mice which were divided into experimental group, vegetable oil control group and blank control group were examined by slight microscopy. Mice in the experimental group were treated with 100 mg/kg all-trans retinoic acid at E10 d to make cleft palate models. Mice in the vegetable oil control group received intragastric administration of 10 mL/kg olive oil. The blank control group had no treatment.

RESULTS AND CONCLUSION: During E13 d, E14 d, and E16 d, positive expression of β -catenin was found in the oral epithelium and the dental lamina, gradually became stronger where cells actively proliferated in the blank control group. The experimental group had similar changing tendency with the blank control group. The level of β -catenin in the blank control group was lower than that of the experimental group during all stages. The same expression level of β -catenin occurred both in the vegetable oil control group and blank control group. The changes of β -catenin expression induced by excess all-trans retinoic acid in the epithelium-mesenchymal interaction regulating morphogenesis of tooth germ may be related to the cleft palate induced by all-trans retinoic acid, and the expression of β -catenin displays an up-regulation tendency, which thus interferes with the development of tooth germ.

Wang LT, Song R, Wang S, Si QZ, Zhang R, Wang JL, Zhao WH. Expression of beta-catenin in tooth germ development of mice with cleft palate. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(50): 9344-9348.

0 引言

β -连环蛋白是一种具有多功能的细胞内可溶蛋白, 作为Wnt信号转导通路的核心成分, 对细胞的增殖、迁移、分化和上皮与间充质间的相互作用等起重要作用, 同时 β -连环蛋白也是钙黏蛋白复合体的组成部分, 在建立和维持细胞间紧密连接, 保持上皮细胞极性中也发挥着重要的作用^[1]。研究表明, β -连环蛋白在牙胚组织中的分布与上皮-间充质间的相互作用密切相关^[2-6]。

近年来对牙齿发育的研究认为, 上皮-间充质的相互作用由包括Wnt信号通路在内的信号分子所介导^[7]。目前已知大约有300多个信号分子参与牙胚发育过程的调节^[8-15]。维甲酸诱导小鼠腭裂已成为研究腭裂病因机制的经典模型^[16]。

目前, 国外对 β -连环蛋白的研究集中于牙齿发育方面^[17-18]。部分腭裂发生时, 伴有牙齿发育异常, 但其发生机制并不明确。通过苏木精-伊红染色和免疫组化技术, 观察 β -连环蛋白在正常牙胚发育和维甲酸诱导腭裂发生过程中牙胚发育中的表达, 探讨其表达变化对下颌第一磨牙牙胚发育的影响。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2011年10月在兰州大学生命科学学院完成。

材料:

实验动物: 10周龄左右的健康成年未经产雌性C57BL/6J近交系小鼠30只, 体质量20-25 g, 由兰州大学实验动物中心提供。

主要试剂: 维甲酸为Sigma产品, β -catenin多克隆抗体、免疫组化试剂盒及浓缩型DAB显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

方法:

建立腭裂动物模型: 选取C57BL/6J近交系小鼠, 实验室环境随昼夜交替明暗周期各12 h, 常规饲料喂养和自由饮水。按雌雄比2:1于晚8时合笼, 次日8时检查雌鼠, 发现阴栓视为妊娠,

定为E0 d。18只孕鼠随机分为3组: 在E10 d, 实验组以维甲酸100 mg/kg对孕鼠行一次性灌胃, 植物油对照组给予10 mL/kg橄榄油灌胃, 空白对照组不做任何处理。

标本制取: 分别于E13 d、E14 d、E16 d上午9时以颈椎脱臼法处死孕鼠, 每期分别随机取胎鼠2只, 在体视显微镜下沿口裂至耳屏前剪开, 充分暴露腭部, 解剖分离胎鼠获得腭裂胎鼠含磨牙胚的下颌骨标本, 立即置于新鲜配置的40 g/L多聚甲醛中, 4 °C固定过夜。序列乙醇脱水, 包埋后冠状向5 μ m连续切片, 苏木精-伊红常规染色, 确定下颌第一磨牙牙胚发育时期及所在位置, 选择良好切片进行免疫组织化学染色。

免疫组织化学染色: 采用免疫组织化学SABC法, 进行 β -连环蛋白多克隆抗体免疫组织化学染色: 切片脱蜡至水, 浸入枸橼酸盐缓冲液内进行微波抗原修复, 室温下体积分数为3%过氧化氢浸泡30 min以消除内源性过氧化物酶, 5%BSA室温封闭30 min, 倾去血清, 滴加1:100稀释的 β -连环蛋白多克隆抗体, 4 °C过夜; 37 °C复温1 h, 滴加生物素化羊抗兔IgG, 37 °C孵育20 min, 最后滴加辣根酶标记链霉卵白素, 37 °C孵育30 min, 以上每一步骤后用PBS(pH=7.4)荡洗3次, 3 min/次, DAB光镜控制下显色, 苏木精复染, 常规脱水, 透明, 中性树胶封固。阴性对照用PBS代替一抗进行孵育。

结果判定: 细胞质或核内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性反应, 根据染色深浅将反应分为阴性(-)、弱阳性(+)、阳性(++)、强阳性(+++)4个等级, 每组标本取其平均值。

主要观察指标: β -连环蛋白在正常及维甲酸诱导腭裂发生过程中下颌第一磨牙牙胚发育中的表达。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色观察牙胚发育变化

蕾状期(E13 d): 对照组下颌第一磨牙牙蕾上皮细胞开始迅速增生, 牙蕾顶端细胞密集。其周围邻近的间充质细胞密度较外围密度高, 细胞增生活跃, 见图1a、b; 实验组与对照组基本一致, 但牙蕾末端增生的细胞数目少, 排列不规则, 见

¹Stomatological School of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ²School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ³Stomatological Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Wang Li-ting★, Studying for master's degree, Stomatological School of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China wangli09@lzu.edu.cn

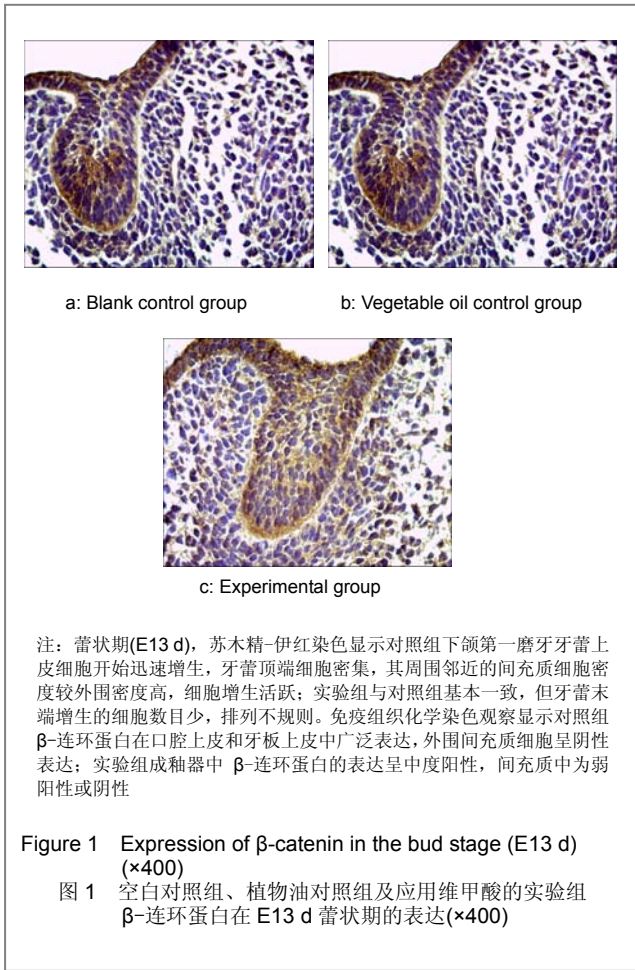
Corresponding author: Wang Jian-lin, Doctor, Professor, School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China jlwang@lzu.edu.cn

Corresponding author: Zhao Wang-hong, Doctor, Professor, Stomatological Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China zhaowh@lzu.edu.cn

Supported by: the International Cooperation Plan of Gansu Province, No. 090WCGA889*; Guangdong Province Talent Introduction Project in Universities, No. C1030636*; the Fundamental Research Funds for the Central Universities, No. lzujbky-2012-160*

Received: 2012-04-13
Accepted: 2012-08-29

图1c.

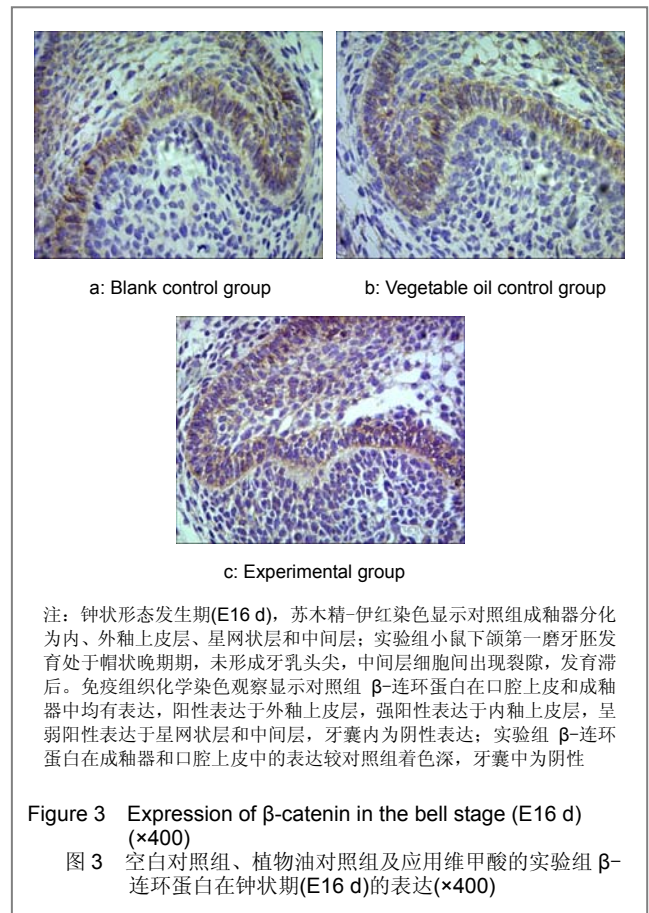
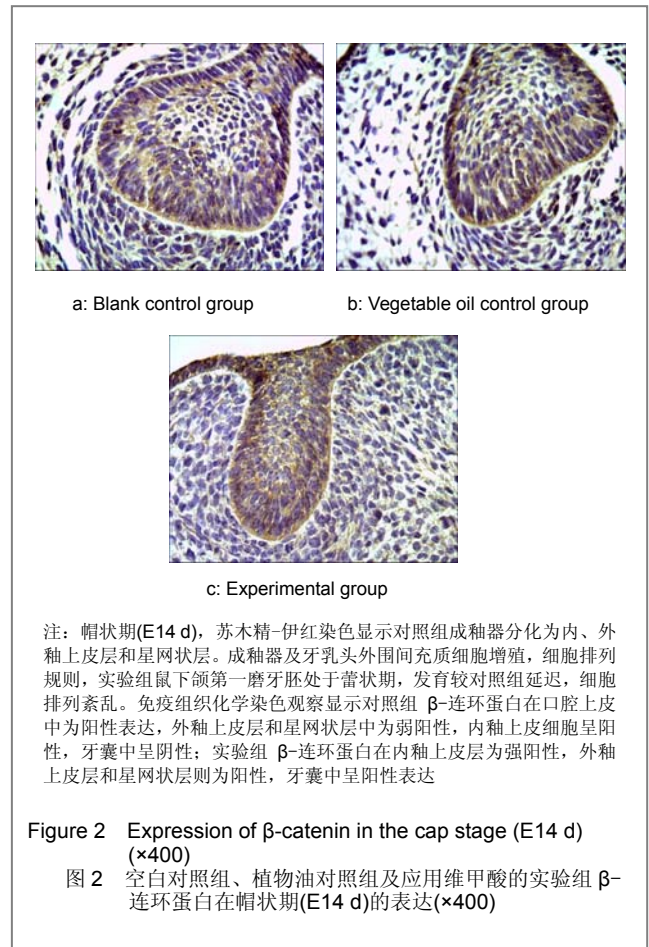


帽状期(E14 d): 对照组牙胚成釉器分化为内、外釉上皮层和星网状层。成釉器及牙乳头外围间充质细胞增殖, 细胞排列规则, 见图2a、b; 实验组鼠下颌第一磨牙胚处于蕾状期, 发育较对照组延迟, 细胞排列紊乱, 见图2c。

钟状形态发生期(E16 d): 对照组动物牙胚成釉器分化为内、外釉上皮层、星网状层和中间层, 见图3a、b; 实验组小鼠下颌第一磨牙胚发育处于帽状晚期, 未形成牙乳头尖, 中间层细胞间出现裂隙, 发育滞后, 见图3c。

2.2 免疫组织化学染色观察 β -连环蛋白在牙胚中的表达

蕾状期时: 对照组 β -连环蛋白在口腔上皮和牙板上皮中广泛表达, 细胞膜、质、核着色, 呈弱阳性, 牙蕾末端上皮细胞阳性表达明显, 其邻近间充质细胞中有弱阳性表达, 外围间充质细胞呈阴性表达, 见图1a、b; 实验组成釉器中 β -连环蛋白的表达呈中度阳性, 间充质中为弱阳性或阴性, 见图1c。



帽状期: 对照组 β -连环蛋白在口腔上皮中为阳性表达, 外釉上皮层和星网状层中为弱阳性, 内釉上皮细胞呈阳性, 尤其在近内釉上皮层的原发性釉结处为强阳性, 着色部位为细胞膜和细胞质; 临近内釉上皮的牙乳头细胞细胞膜、质、核中见弱阳性表达。牙囊中呈阴性, 见图2a、b; 实验组 β -连环蛋白在内釉上皮层为强阳性, 外釉上皮层和星网状层则为阳性, 牙囊中呈阳性表达, 见图2c。

钟状形态发生期: 对照组 β -连环蛋白在口腔上皮和成釉器中均有表达, 阳性表达于外釉上皮层, 强阳性表达于内釉上皮层, 呈弱阳性表达于星网状层和中间层, 牙乳头内前成牙本质细胞的细胞质、细胞膜、细胞核见阳性表达, 牙囊内为阴性表达, 见图3a、b; 实验组 β -连环蛋白在成釉器和口腔上皮中的表达较对照组着色深, 牙囊中为阴性, 见图3c。

空白对照组 β -连环蛋白在蕾状期、帽状期、钟状期随牙胚的发育其表达呈逐渐上调的趋势, 实验组 β -连环蛋白的变化也表现为这一趋势, 且实验组 β -连环蛋白在3个不同时期的牙胚中, 表达均高于空白对照组。 β -连环蛋白在植物油对照组和空白对照组的表达无明显差异。

3 讨论

牙胚的发生是胚胎时期口腔牙源性上皮与其下方的颅神经嵴细胞来源的外胚间充质相互作用的结果^[19], 期间受到一系列转录分子、信号分子、生长因子受体和细胞外基质分子的调控。Kronmiller等^[20]利用体外培养手段, 发现过量维甲酸可造成钟状期牙胚出现成牙本质细胞和成釉细胞分化障碍。实验结果表明, 过量维甲酸可使实验组小鼠蕾状期、帽状期和钟状期的牙胚发育滞后, 与上述学者的研究结果相似。本实验中, 实验组钟状期牙胚不能形成正常牙乳头尖, 与高玉光等^[2]的研究一致。

作为Wnt信号转导通路的重要组成部分, β -连环蛋白在细胞内的稳定和累积是该信号通路中最关键的事件^[21]。无Wnt信号时, 在支架蛋白Axin的协助下, Gsk-3磷酸化 β -连环蛋白使其降解。而当有Wnt信号时, β -连环蛋白在细胞内大量累积并进入核内与TCF/LEF转录因子结合, 从而激活靶基因的表达, 促使细胞增殖。因此, β -连环蛋白可以存在于细胞的胞核、膜和胞浆3个部位, 其在特定细胞中的功能与亚细胞定位和磷酸化有关^[22]。胞浆内游离的 β -连环蛋白是信号通路的关键信号

分子, 在基因转录方面起重要作用。实验观察了 β -连环蛋白在牙胚3个不同发育阶段的表达, β -连环蛋白在成釉器各层细胞和牙乳头、成牙本质细胞中均有表达, 而且以内釉上皮层阳性表达程度最高, 对照组和实验组都显示出这一表达趋势, 这与Fausser等^[23]的研究结果基本一致。正常情况下, β -连环蛋白的限性表达保证了细胞的正常生长、凋亡^[3]。3个时期的实验组 β -连环蛋白在牙胚中表达水平均高于对照组, 可能是由于过量维甲酸通过上调 β -连环蛋白在成釉器中的表达, 干扰了上皮与间充质之间相互作用的结果。说明其精确的表达对于牙胚发育具有调控作用。

以往研究表明, β -连环蛋白在蕾状期成釉器的内釉上皮细胞表达较其他部位强烈^[17-18], 说明 β -连环蛋白参与此期内釉上皮细胞的增殖。Järvinen等^[4]的研究显示 β -连环蛋白是釉结的上游活化剂, 牙板上皮中稳定表达的 β -连环蛋白能够引导牙齿发生。Obara等^[17-18]通过研究 β -连环蛋白在帽状期牙胚釉结中的分布, 发现 β -连环蛋白在细胞浆和细胞核中表达的动态变化, 揭示了在牙齿发育过程中细胞黏附和Wnt信号途径间存在联系。Obara等还分析了小鼠磨牙牙胚发育过程中 β -连环蛋白基因表达的变化, 发现在帽状期和钟状期, 釉结、内釉上皮和分化中的中间层比成釉器其他成分表达更多的 β -连环蛋白基因, 该基因表达的强度在内釉上皮层和中间层有一定的差异, 并且这些差异一直持续到钟状晚期即内釉上皮细胞分化为成釉细胞时才逐渐消失。

β -连环蛋白具有细胞黏附和信号传导两个功能。从牙板开始形成到蕾状期结束, 上皮细胞增殖能力强, 与邻近间充质的相互诱导也非常活跃, 此过程中 β -连环蛋白的阳性表达提示它可能参与了成釉器发育的启动。在蕾状期时 β -连环蛋白主要分布于细胞膜、质、核中, 到帽状期和钟状期时主要位于细胞膜、质中。 β -连环蛋白参与牙胚发育可能是以发挥上述功能为途径实现的。其在细胞膜上的表达与参与细胞黏附有关, 而在细胞质和细胞核中出现则与它介导WNT信号传导并引起细胞增殖的作用有关。本实验表明, 实验组成釉器中细胞数目较少, 排列紊乱, 增殖不活跃, 发育相对滞后。可能是维甲酸改变了 β -连环蛋白在牙胚中的表达, 细胞内游离的 β -连环蛋白增加, 细胞黏附、增殖受到影响, 导致牙胚发育受阻。

实验表明, 维甲酸诱导小鼠腭裂发生过程中, 在牙胚发育的蕾状期、帽状期和钟状形态发生期, 实验组 β -连环蛋白在成釉器中的表达水平均高于同时期的对照组。牙胚出现发育延迟的现象, 原因可能是维甲酸干扰

了上皮-间充质间的相互作用。因此, 深入揭示该研究中维甲酸是如何通过引起牙胚中 β -连环蛋白表达上调, 在调控牙胚发育方面发挥其内在的作用, 仍待进一步研究; 并且在丰富维甲酸对牙胚发育影响基础理论的同时, 为该领域提供一个新的研究方向。

致谢: 在本实验完成过程中得到了兰州大学生命科学学院李海燕老师、李加龙同学等的热心帮助和支持, 在此致以诚挚的谢意!

4 参考文献

- [1] Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):499-508.
- [2] Gao YG, Fan MW, Bian Z, et al. *Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi.* 1998;33(6): 358-359.
高玉光, 樊明文, 边专, 等. 维甲酸对小鼠牙胚冠部形态发生的影响 [J]. *中华口腔医学杂志*, 1998, 33(6): 358-359.
- [3] Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci.* 2003; 94(3):225-229.
- [4] Järvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, et al. Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/ β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(49):18627-18632.
- [5] Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech Dev.* 1999;85(1-2): 197-200.
- [6] Dassule HR, McMahon AP. Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol.* 1998; 202(2): 215-227.
- [7] Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech Dev.* 1999;85(1-2): 197-200.
- [8] Thesleff I, Aberg T. Molecular regulation of tooth development. *Bone.* 1999;25(1):123-125.
- [9] Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Haikel Y, et al. Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(1):103-112.
- [10] Alappat S, Zhang ZY, Chen YP. Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res.* 2003;13(6):429-442.
- [11] Tabata MJ, Fujii T, Liu JG, et al. Bone morphogenetic protein 4 is involved in cusp formation in molar tooth germ of mice. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(2):114-120.
- [12] Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, et al. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development.* 1998;125(15):2803-2811.
- [13] Gritti-Linde A, Bei M, Maas R, et al. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development.* 2002;129(23):5323-5337.
- [14] Kettunen P, Laurikkala J, Itäranta P, et al. Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Dev Dyn.* 2000;219(3):322-332.
- [15] Huber O, Korn R, McLaughlin J, et al. Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev.* 1996;59(1):3-10.
- [16] Abbott BD, Harris MW, Birnbaum LS. Etiology of retinoic acid-induced cleft palate varies with the embryonic stage. *Teratology.* 1989;40(6):533-553.
- [17] Obara N, Lesot H. Subcellular localization of β -catenin and cadherin expression in the cap-stage enamel organ of the mouse molar. *Histochem Cell Biol.* 2004;121(4):351-358.
- [18] Sorkin BC, Wang MY, Dobeck JM, et al. The cadherin-catenin complex is expressed alternately with the adenomatous polyposis coli protein during rat incisor amelogenesis. *J Histochem Cytochem.* 2000;48(3):397-406.
- [19] Pispa J, Thesleff I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol.* 2003;262(2):195-205.
- [20] Kronmiller JE, Upholt WB, Kollar EJ. Alteration of murine odontogenic patterning and prolongation of expression of epidermal growth factor mRNA by retinol in vitro. *Arch Oral Biol.* 1992;37(2):129-138.
- [21] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science.* 2004;303(5663):1483-1487.
- [22] van Noort M, Meeldijk J, van der Zee R, et al. Wnt signaling controls the phosphorylation status of β -catenin. *J Biol Chem.* 2002;277(20):17901-17905.
- [23] Fausser JL, Schlepp O, Aberdam D, et al. Localization of antigens associated with adherens junctions, desmosomes, and hemidesmosomes during murine molar morphogenesis. *Differentiation.* 1998;63(1):1-11.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 甘肃省国际合作计划项目 (090WCGA889); 2011 年度广东省高校人才引进项目 (C1030636); 中央高校基本科研业务费专项资金自由探索面上项目 (lzujbky-2012-160)。

作者贡献: 王利婷、赵望泓、王建林进行实验设计, 实验实施为王利婷、宋容、王莎、司庆宗、张瑞, 实验评估为赵望泓、王建林, 资料收集为王利婷, 王利婷成文, 赵望泓、王建林审校, 王利婷对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

研究的创新之处与不足: 选题紧密结合牙齿发育生物学中信号传导的热点问题, 研究目的明确, 方法科学, 结果可信。建议延长牙胚发育时期, 进一步观察牙胚发育过程中的形态学变化和 β -连环蛋白的表达变化。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。