论著

文章编号:1000-5404(2005)14-1436-04

FGF8在神经胚形成和NTD中的表达变化及其与STAT3的关系研究

纪 华[1],李泽桂[1],丁震宇[1],马 路[2],李红丽[1],蔡文琴[1],常智杰[3],刘 力[3],傅新元[3] ([1]第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038;[2]重庆医科大学附属第一医院解剖学教研室,重庆 400016;[3]清华大学生命科学与技术学院基因组研究所,北京 100084)

提 要:目的 探讨FGF8在神经胚形成和神经管缺陷(NTD)发生过程中的作用及其可能的分子调控机制。**方法** 采用全胚胎原位杂交技术观察FGF8在胚胎神经胚形成中的表达;通过喂服过量的维甲酸(retinoic acid, RA)诱导NTD模型,观察NTD鼠胚FGF8和STAT3的表达变化。**结果** ①在E8.75d整个鼠胚几乎没有FGF8的表达;到E9.5d、E10.5d,在前脑泡的前缘、脑峡部位和神经管的末端观察到较局限的紫蓝色阳性区域,但到E10.5d时,上述3个部位的染色较E9.5d减弱;E11.5d时阳性信号主要集中在中脑部位。②FGF8在NTD鼠胚的表达,E9.5d时脑峡部位的染色减弱,前脑泡的前缘和神经管的尾端染色略有减弱;E10.5d,脑峡部位染色加深,且范围扩大,前脑泡的前缘和神经管的尾端染色较正常减弱。③STAT3在NTD鼠胚的表达,E9.5d和E10.5d时,STAT3的表达较正常鼠胚明显减少,在前脑泡和中脑泡均无明显的STAT3 mRNA表达的阳性信号。**结论** FGF8可能作为STAT3的上游分子,二者共同参与了神经管的关闭。

关键词: FGF8;STAT3;神经胚形成;神经管缺陷

中图法分类号: R321.6; R329.1; R977 **文献标识码:** A

Expression of FGF8 mRNA in neurulation and NTD and its relationship with STAT3

JI Hua[1], LI Ze-gui[1], DING Zhen-yu[1], MA Lu[2], LI Hong-li[1], CAI Wen-qin[1], CHANG Zhi-jie[3], LIU Li[3], FU Xin-yuan[3] ([1]Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Anatomy, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016; [3]Institute of Genome, Life Science and Technology College, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Objective To investigate the roles and possible molecular mechanism of FGF8 in the neurulation and neural tube defect (NTD). **Methods** FGF8 mRNA expression during neurulation was detected using whole-mount embryo *in situ* hybridization, as well as the changes of FGF8 mRNA expression and STAT3 mRNA expression in NTD induced by retinoic acid (RA). **Results** ① FGF8 was hardly detected in the whole embryos at E8.75d, but at E9.5d, FGF8 mRNA expression was found at the most anterior border of prosencephalon, isthmus and the end of neural tube. At E10.5d, the decreased expression of FGF8 mRNA was still observed in the above-mentioned three regions. During the late stage of neurulation, FGF8 mRNA expression was only detected in the mesencephalon at E11.5d. ②In the NTD embryos, FGF8 mRNA expression in the isthmus was weaker than that of the control at E9.5d, as well as stronger and more extensive than that of normal embryos at E10.5d. The signal of FGF8 mRNA in the anterior border of prosencephalon and in the end of neural tube was slightly weaker than that of normal embryos. ③As compared with the normal embryos, the expression of STAT3 mRNA was dramatically decreased at E9.5d and E10.5d in NTD embryos and undetectable in the prosencephalon and mesencephalon. **Conclusion** FGF8 might activate STAT3 in the STAT pathway during neurulation, and both of them may be involved in the closure of neural tube.

Key words: STAT3; FGF8; neuralation; neural tube defect

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170983),重庆市人口计划生育委员会第3批科研项目计划资助项目(2004)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170983) and the Third Research Project of Chongqing Family Planning Committee (2004)

作者简介: 纪 华(1974-),女,山西省孝义市人,硕士,医师,主要从事发育神经生物学方面的研究。电话:(023)68752229

通讯作者: 李泽桂,电话:(023)68753231,E-mail: lzgui@yahoo.com

收稿日期: 2004-06-25;**修回日期:** 2004-09-20

神经管的发生是关系到建立中枢神经系统原基的重要胚胎学事件,在这个过程中,神经板必须准时准确地关闭形成神经管,否则将出现神经管缺陷(neural tube defect, NTD)和随之而来的脊柱裂或无脑等常见畸形,但是迄今对此复杂过程的基因表达与确切调控途径均知之甚少。许多文献报道神经管的关闭过程受到多种基因形成的网络调控及环境因素的影响[1]。

成纤维细胞生长因子-8(fibroblast growth factor-8, FGF8)只在胚胎的早期增殖和神经分化阶段表达,参与神经的早期发育和分化[2]。胚胎早期发育阶段,作为转录因子的信号转导和转录激活因子-3(signal transducer and activator of transcription factor-3, STAT3)在胚外组织和胚胎的表达[3],以及 STAT3-/-小鼠在其胚胎发育至 E6.5d 时就退化的现象说明,STAT3 对于早期胚胎的存活是必须的[4]。已知 FGFs 是激活 STATs 的重要生长因子之一,FGF 在神经系统发育中的广泛分布和促进神经分化作用的进一步明确[5],有理由认为,在神经管正常发育中,FGF 与 STAT 蛋白可能处于同一条信号通路。但这条信号通路在神经管缺陷(neural tube defect, NTD)发生中的确切作用目前尚未见国内外文献报道。本实验采用全胚胎原位杂交技术观察了 FGF8 在胚胎发育中的时空表达情况;通过喂服过量的维甲酸(retinoic acid, RA)诱导 NTD 模型[6],观察 NTD 鼠胚 FGF8 和 STAT3 的表达变化,比较 FGF8 和 STAT3 的变化规律及其可能的关系,探讨 FGF8 在正常神经管关闭和 NTD 发生过程中的作用及其可能的分子调控机制。

1　材料与方法

1.1　动物和标本采集

成年昆明种小鼠 16 只(体质量平均为 25 g),本校实验动物中心提供。将成年昆明种小鼠于下午 18:00 按雌雄 1∶1 合笼,次日晨 8:00 取出,检查雌鼠的阴道口有无阴栓,将发现阴栓的当天中午定为胚胎 0.5d(embryonic day 0.5, E0.5d)。在孕期为 E8.75d($n=4$)、E9.5d($n=5$)、E10.5d($n=4$)、E11.5d($n=3$)时,颈椎脱臼法处死孕鼠,在解剖显微镜下剥离,获得各阶段的鼠胚,固定备用。

1.2　主要试剂

限制性内切酶(TAKARA);地高辛探针标记试剂盒(Roche);全反式维甲酸(RA)(Sigma)。

1.3　动物模型制备

成年昆明种小鼠 27 只(体质量平均为 25 g),本校实验动物中心提供。维甲酸按 50 mg/kg 于孕期 E7.5d ~ 7.75d 时一次性喂服孕鼠。在孕期为 E9.5d($n=9$)、E10.5d($n=11$)、E11.5d($n=7$)时,颈椎脱臼法处死孕鼠,获得各阶段的 NTD 鼠胚,固定备用。

1.4　探针制备

以 STAT3 开放阅读框的一段特异性序列为模板设计引物,分别在引物的 5′端加入 RNA 聚合酶启动子 SP6 和 T7,通过 PCR 反应合成长度为 431 bp 的片段,以此片段为模板使用地高辛探针标记试剂盒标记 STAT3 cRNA 探针。

FGF8 质粒上携带有 RNA 聚合酶启动子 T7 和 T3,用限制性内切酶 PstI 将 800 bp 的插入片段在 450 bp 处切断,使质粒线性化,以此片段为模板应用地高辛标记试剂盒标记 FGF8 cRNA 探针。

1.5　全胚胎原位杂交

将 E8.75d、E9.5d、E10.5d、E11.5d 胚胎入含有 1 μg/ml FGF8 反义探针或 1 μg/ml STAT3 反义探针的杂交液;抗地高辛抗体 1∶1 000孵育过夜;用 NBT/BCIP 在暗处显色。

用含正义 FGF8 cRNA 探针及不含探针的杂交液和含正义 STAT3 cRNA 探针的杂交液分别代替含反义 FGF8 cRNA 或反义 STAT3 cRNA 探针的杂交液进行对照实验。

2　结果

2.1　正常及 RA 致 NTD 鼠胚的形态学观察

E8.5d 鼠胚胚体尚未完全转体,神经管没有闭合;E9.5d 时,胚体已经完成转体,神经管绝大部分闭合,仅有尾部后神经孔尚未闭合(至 E9.75d 才能完全闭合);至 E10.5d,神经管完全关闭,胚胎进一步发育。与正常对照组相比,喂服 RA 后,E9.5 ~ 10.5d 时胚胎形态多样,主要为前脑顶部和后脑未闭合,在少数胚胎可发现整个神经管未闭合,呈开放状态。

2.2　FGF8 在正常神经管形成中的表达

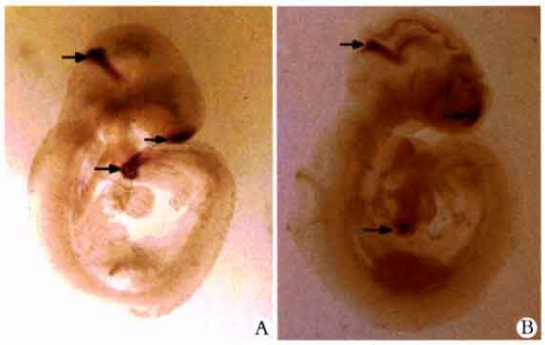
在 E8.75d 整个鼠胚几乎没有观察到 FGF8 mRNA 的表达;到 E9.5d、10.5d,在前脑泡的前缘、脑峡部位和神经管的末端观察到较局限的紫蓝色阳性区域,但到 E10.5d 时,上述 3 个部位的染色较 E9.5d 减弱;到 E11.5d 脑峡部位基本已无阳性信号,阳性信号主要集中在中脑部位(图 1,箭头示阳性信号部位)。

2.3　FGF8 在 NTD 鼠胚神经管的表达

E9.5d 时可以观察到脑峡部位的染色减弱,前脑泡的前缘和神经管的尾端染色略有减弱;E10.5d,与正常胚胎相比,NTD 鼠胚脑峡部位染色加深,且范围扩大,前脑泡的前缘和神经管的尾端染色较正常减弱(图 2,箭头示阳性信号部位)。

2.4　STAT3 在 NTD 鼠胚神经管的表达

E9.5d 和 10.5d 时,STAT3 mRNA 的表达较正常鼠胚明显减少,在前脑泡和中脑泡均未观察到明显的 STAT3 mRNA 表达的阳性信号。

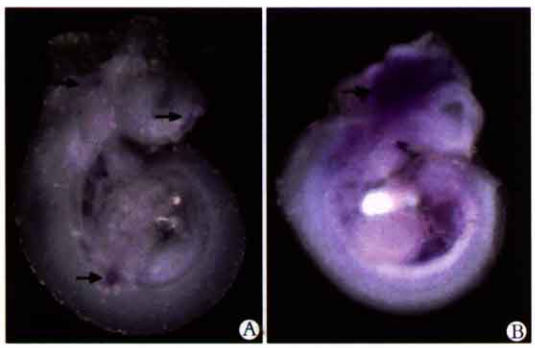


A: E9.5d (×30); B: E10.5d (×20)

↑: Positive FGF8 mRNA expression

图1 小鼠胚胎 FGF8 mRNA 的表达(全胚胎原位杂交)

Fig 1 FGF8 mRNA expression in mouse embryo by whole-mount embryo *in situ* hybridization



A: E9.5d(×30); B: E10.5d (×20)

↑: Positive FGF8 mRNA expression

图2 NTD 鼠胚 FGF8 mRNA 的表达(全胚胎原位杂交)

Fig 2 FGF8 mRNA expression in mouse embryo with NTD by whole-mount embryo *in situ* hybridization

3 讨论

3.1 FGF8 在小鼠正常神经胚形成和 NTD 中的表达变化

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)作为直接的神经诱导分子,调节早期神经发育阶段的许多关键过程,尤其是对鸟类胚胎的研究表明,FGFs 能够从两胚层胚盘时期的上胚层诱导神经组织,并对形成的神经组织发挥作用[7],其中 FGF8 涉及神经的早期发育和分化。作为次级组织者的脑峡区有 FGF8 的表达,脑峡处的 FGF8 在调节中脑的极化和细胞增生方面发挥重要作用[8]。

我们在 RA 诱导所致 NTD 鼠胚模型中观察到,一个明显变化就是脑峡部位 FGF8 mRNA 的表达由 E9.5d 时的减弱变为 E10.5d 时的增强。结果提示,NTD 的发生可能是 RA 通过介导 FGF8 发挥作用的。Aoto 等[9]研究发现,FGF8 阳性表达增加的区域,细胞凋亡减少。据此我们可以推测:在 E9.5d 时,RA 引起 FGF8 mRNA 表达下调,细胞凋亡增加致 NTD 发生;随着致畸因素作用时间的延长,神经管可能通过增强 FGF8 的表达试图使细胞凋亡减少来促进神经管关闭,就出现了 E10.5d 时 FGF8 mRNA 表达的增强。

Scholpp 等[10]发现 FGFR1 在脑峡也有表达,这与本实验中 FGF8 的表达是相似的,提示 FGF8 可能通过 FGFR1 发挥作用,成为促使神经管关闭的因素之一。Deng 等[11]发现 FGFR1 对于小鼠神经管的发育是必要的,FGFR1 变异的胚胎在原肠胚阶段就不能存活。FGFR1 表达异常的胚胎会出现脊柱裂和肢芽畸形等,说明 FGFR1 在神经胚形成时具有重要作用,提示 FGFR1 介导的信号途径和 NTD 之间有一定的联系。这从一个方面说明,RA 作用于孕鼠,可能引起胚胎 FGF8 的表达变化,并通过 FGFR1 介导的信号转导途径,引起靶基因表达异常。这可能是 NTD 发生的机制之一。

3.2 FGF8 通过激活 STAT3 信号转导途径参与神经管关闭的可能机制

斑马鱼的 STAT3 与小鼠相比有 86.5% 的同源性,而且它与哺乳类动物 STAT3 之间的几个特征性结构域是高度保守的。通过对斑马鱼的研究表明,原肠胚阶段磷酸化的 STAT3 蛋白局限分布于胚胎的背侧,而这一区域就包括了未来的组织者[12],还发现这一时期来源于组织者的细胞可以驱使轴中胚层(axial mesoderm)细胞向前迁移和侧中胚层(nonaxial mesoderm)细胞向背侧迁移,使胚胎在原肠胚末期具有正常的形态和结构。这个过程中组织者细胞必须通过 STAT3 的激活才能完成[13]。由此提示我们,信号分子 FGF8 与相应受体结合后可能激活 JAK/STAT 信号转导途径,进而启动靶基因转录。我们在实验中观察到,STAT3 mRNA 和 FGF8 mRNA 的表达在正常胚胎有重叠,尤其是前脑泡。在 RA 诱导的 NTD 模型中二者都发生了变化,由此可以推测,由于 E9.5d 时 FGF8 和 STAT3 二者的表达都减弱,可能阻断了神经管关闭时需要的正常信号转导和靶基因表达,是 NTD 发生的可能机制之一。E10.5d 时脑峡部位 FGF8 mRNA 表达增强,且范围扩大,这可能是由于胚胎具有的一种代偿机制,希望通过增强 FGF8 的表达试图促使神经管关闭,就出现了 E10.5d 时 FGF8 mRNA 表达的增强。但可能因为 STAT3 mRNA 的表达仍下调,FGF8 不能充分激活 JAK/STAT 信号转导途径并引起其后的一系列生物效应,所以仍然不能阻止 NTD 发生。

作为一种转录因子,STAT3 也可以被其它信号分子激活,启动靶基因转录,使神经管关闭[14]。FGF8 和 STAT3 之间并不是一对一的关系,它们只是复杂调控网络的两个环节,通过对它们作用机制的认识有助于进一步了解神经管关闭的分子作用模式。因为神经管关闭的过程是一系列基因按高度特异的时空模式表达与相互作用的结果,FGF8 和 STAT3 有可能参与这个

复杂过程,它们的表达变化可能是 NTD 发生的机制,外环境因素可能也是通过它们来发挥对神经系统的致畸作用,但是这仅仅可能为 NTD 发生的机制之一,有许多其它的基因和信号转导途径也参与 NTD 的发生,它们共同组成了一个复杂而精细的网络,对这一复杂过程还需要进一步研究。

(致谢:本实验中 fgf8 质粒由中国科学院上海神经科学研究所景乃禾教授提供,特此致谢)

参考文献:

[1] 李泽桂, 蔡文琴, 陈活彝. 神经管发生中的形态学事件和分子机制[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(8): 613 - 616.

[2] Ford Perriss M, Abud H, Murphy M. Fibroblast growth factors in the developing central nervous system[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2001, 28(7): 493 - 503.

[3] Duncan S A, Zhong Z, Wen Z, *et al*. STAT signaling is active during early mammalian development [J]. Dev Dyn, 1997, 208 (2): 190 - 198.

[4] Takeda K, Noguchi K, Shi W, *et al*. Targeted disruption of the mouse STAT3 gene leads to early embryonic lethality[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94 (8): 3801 - 3804.

[5] 纪　华, 李泽桂. FGF 与中枢神经系统[J]. 解剖科学进展, 2004, 10(2): 185 - 188.

[6] 李泽桂, 蔡文琴, 魏喜全, 等. 神经管发育和神经管缺陷中转染重组 bcl - 2 的作用[J]. 中国临床康复, 2003, 7(32): 4357 - 4358.

[7] Alvarez I S, Araujo M, Nieto M A. Neural induction in whole chick embryo cultures by FGF[J]. Dev Biol, 1998, 199 (1): 42 - 54.

[8] Martinez S. The isthmic organizer and brain regionalization[J]. Int J Dev Biol, 2001, 45(1): 367 - 371.

[9] Aoto K, Nishimura T, Eto K, *et al*. Mouse GLI3 regulates Fgf8 expression and apoptosis in the developing neural tube, face, and limb bud[J]. Dev Biol, 2002, 251 (2): 320 - 332.

[10] Scholpp S, Groth C, Lohs C, *et al*. Zebrafish fgfr1 is a member of the fgf8 synexpression group and is required for fgf8 signalling at the midbrain - hindbrain boundary[J]. Dev Genes Evol, 2004, 214(6): 285 - 295.

[11] Deng C, Bedford M, Li C, *et al*. Fibroblast growth factor receptor - 1 (FGFR - 1) is essential for normal neural tube and limb development[J]. Dev Biol, 1997, 185 (1): 42 - 54.

[12] Hou S X, Zheng Z, Chen X, *et al*. The Jak/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement[J]. Dev Cell, 2002, 3 (6): 765 - 778.

[13] Yamashita S, Miyagi C, Carmany Rampey A, *et al*. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation[J]. Dev Cell, 2002, 2 (3): 363 - 375.

[14] 纪　华,李泽桂,马　路,等. STAT3 在小鼠胚胎神经系统发育中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(7): 592 - 595.

(编辑　陈聪连)

(上接 1435 页)

2　结果

24 例肺活检获取满意标本,成功率 96.0% (24/25)。组织细胞学病理诊断,明确恶性病变 19 例,占 79.2% (19/24);良性慢性炎症 5 例占 20.8% (5/24)。19 例恶性病变,6 例行开胸探查或切除,术后组织细胞学病理诊断与活检标本诊断相符。13 例行放疗或化疗中,CT 随访 3 ~ 13 个月,其中 5 例死于恶性肿瘤转移,8 例肺结节增大或有远处转移。良性病变 5 例,经抗炎治疗,肺结节缩小或消失,随访 6 ~ 9 个月,无变化。恶性病变最终被诊断 19 例,未见假阳性,其准确度为 100%。良性病变最终被诊断 5 例,其敏感度为 100%

活检后发生气胸 1 例,占 4.0% (1/25),经胸腔引流 24 h 而愈;出血 2 例(1 例肺实质出血,1 例胸腔内少量积血)占 8.0% (2/25),均经止血,对症治疗而愈;无咳血病例,无严重并发症。

3　讨论

CT 引导经皮肺活检成为广泛的诊断方法。普通 CT 和螺旋 CT 扫描现被广泛采用[2]。最早报道用 CT 引导细针抽吸活检获取细胞学诊断,被应用于鉴别良性和恶性病变。近年来用切割针获取组织标本进行组织细胞病理学检查,进一步提高诊断的准确性。活检成功率依赖于肺结节大小、位置,和有无其他疾病存在。文献[3]报道 < 2 cm 肺结节能获取满意标本。肺上叶活检获取标本较下叶为困难,对比本组 1 例上叶肺结节未能获满意标本,其活检成功率为 96.0% (24/25)。

肺活检目的是区分良性或恶性病变,为选择合适治疗提供依据。细胞学诊断在估价和诊断肺结节是有价值的,然而组织细胞病理诊断更具有准确性。对比本组,诊断良性和恶性病变准确率高达 100%,组织学检查和细胞学特殊分型和最终外科手术和随访治疗结果相符。可能与本组病例肺结节均 > 2.0 cm,和病例数较少有关。我们有限病例,难以确定肺上叶、中叶及下叶结节活检诊断准确度的异同。

CT 引导经皮肺穿刺活检最常见并发症为气胸和出血,我们有限病例气胸发生率仅为 4.0% (1/25),可能与肺结节较大有关。未发现与肺存在疾病有密切关系。本组 2 例发生出血,占 8.0% (2/25),经保守治疗而愈。与国外报道相符。

CT 引导经皮肺活检获取组织细胞病理学诊断,其操作方法简单,诊断准确性及敏感性高,并发症低,具有较高安全性。是一较好的判断肺结节良性和恶性病变的方法,为选择合适治疗方法提供组织细胞学依据。

关键词:活检;CT 引导;肺活检

中图法分类号:R446.8　　文献标识码:B

参考文献:

[1] Yamagami T, Iida S, Kato T, *et al*. Usefulness of new automated cutting needle for tissue-core biopsy of lung nodules under CT fluoroscopic guidance[J]. Chest, 2003, 124(1): 147 - 154.

[2] Laurent F, Latrabe V, Vergier B, *et al*. Percutaneous CT-guided biopsy of the lung: comparison between aspiration and automated cutting needles using a coaxial technique[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2000, 23(4): 266-272.

[3] Gupta S, Krishnamurthy S, Broemeling L D, *et al*. Small (< / = 2-cm) subpleural pulmonary lesions: short- versus long-needle-path CT-guided Biopsy - comparison of diagnostic yields and complications[J]. Radiology, 2005, 234 (2): 631 - 637.

(编辑　薛国文)