皮肤病学 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001136

TCDD诱导胎鼠腭裂的实验研究进展

王 晨，袁心刚，傅跃先

（重庆医科大学附属儿童医院烧伤整形科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、重庆市儿科学重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地，重庆 400014）

【摘 要】**目的**：总结归纳 2,3,7,8-四氯二苯二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin,TCDD)诱导胎鼠腭裂的实验研究现状，为深入探讨 TCDD 致胎鼠腭裂的发生机制提供新的思路。**方法**：通过中国知网、NCBI 等国内外文献库检索“TCDD”“腭裂”等关键词，搜集已有文献资料。**结果**：目前的资料显示，可以通过约 20 μg/kg 剂量的 TCDD 给予孕第 9~14 天的小鼠单次灌胃建立稳定的胎鼠腭裂模型。在此基础上发现，TCDD 诱导不涉及腭突体积变化，主要通过抑制腭突接触融合而发挥致腭裂效应。对于发育中的腭组织细胞，TCDD 能改变一系列调节细胞增殖、分化、凋亡的生长因子及其受体的表达，主要包括表皮细胞生长因子(epidermal growth factor,EGF)、转化生长因子(transforming growth factor,TGF)、芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor,AhR)。这些分子的表达变化尚存在争议。腭融合过程中发挥关键作用的腭中缝上皮细胞(medial edge epithelium,MEE)，其细胞命运转归尚未阐明。**结论**：TCDD 诱导胎鼠腭裂的体内实验基础相对完善。腭发育调控机制纷繁复杂，注重器官发育的时空动态性对于进一步研究至关重要。腭器官离体培养将是重要的体外实验环节。实验技术和条件的变革对于本领域的研究进展显得愈加迫切。

【关键词】2,3,7,8-四氯二苯二噁英；胎鼠；腭裂模型

【中图分类号】R726.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-09-18

Experimental research progress on murine cleft palate induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

Wang Chen, Yuan Xingang, Fu Yuexian

(*Department of Burn and Plastic Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders*)

【Abstract】***Objective***: To summarize the experimental research progress on murine cleft palate induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) and to provide new thoughts for further mechanisms in TCDD-induced murine cleft palate. ***Methods***: Literatures from domestic and foreign database including CNKI and NCBI were reviewed, searching the keywords of "cleft palate" "TCDD", etc. ***Results***: Data up till now showed that a stable fetal cleft palate model could be established by treating pregnant mice with a single oral administration of approximate 20 μg/kg of TCDD from gestation day 9 to 14. Palate size altering was not involved in this model. TCDD inhibited palate contact and fusion to induce fetal cleft palate. TCDD altered the expression of a series of growth factors and receptors including epidermal growth factor(EGF), transforming growth factor(TGF) and aryl hydrocarbon receptor(AhR) which could regulate cell proliferation, differentiation and apoptosis in palate tissue. Expression alterations of these molecules were still controversial. The cell fate of medial edge epithelium(MEE) which was vital to palate fusion was still not clear. ***Conclusion***: The basis of studies in vivo on TCDD-induced fetal cleft palate is comparatively refined. Regulation mechanisms in palatal development are complicated. It is crucial to notice the space-time dynamics in organgenesis in further research. Culture of palate organ will be an important part of studies in vitro. Revolution of experimental technique and condition appears even more necessary and urgent for research progress in this field.

【Key words】2,3,7,8-tetrachlrodibenzo-p-dioxin; fetal mice; cleft palate model

作者介绍：王 晨，Email:406797478@qq.com，研究方向：腭裂的发病机制。

通信作者：傅跃先，Email:yuexianfu@163.com。

基金项目：国家自然科学基金青年基金资助项目（编号：81202167）；重庆市渝中区科技计划资助项目（编号：20130121、20150112）；国家临床重点专科建设资助项目（编号：国卫办医函[2013]544）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170103.1629.024.html (2017-01-03)

腭裂是一种严重的颅颌面部出生缺陷。目前其病因的主流解释是“阈值学说”，认为妊娠期遗传因子与环境因子交互作用超过一定阈值而造成胚胎腭发育障碍，但具体的发病机制尚未阐明。我国作为腭裂高发区，近年来腭裂发病率呈现上升趋势，一定程度上与城市化伴随的环境污染加重相关。2，3，7，8-四氯二苯二恶英（2，3，7，8-tetrachlorodiben-zo-p-dioxin，TCDD）是一种广泛存在且性质稳定的环境毒物，易于蓄积而产生胚胎致畸效应。过去数十年，国内外学者通过 TCDD 建立了胎鼠腭裂模型，在与糖皮质激素药物（glucocorticoid，GC）和维生素 A 类似物建立的胎鼠腭裂模型的比较中，发现了 TCDD 致腭裂的独特之处。然而目前 TCDD 诱导的胎鼠腭裂实验研究不断趋缓，研究热度不断下降。本文通过检索已有的 TCDD 致胎鼠腭裂模型的实验研究文献，分析实验进展趋缓的原因并提出有价值的研究方向，将有利于腭裂动物模型实验研究的进一步开展，深入了解先天性腭裂的发病机制。

1 TCDD 诱发胎鼠腭裂的特点

小鼠胚胎腭发育与人类有着很高的相似性，并且小鼠繁殖能力强、胚胎期短，因而小鼠最常被用于腭裂建模，其主要品系有 C57BL/6J、C57BL/6N、A/J、ICR 等，以及它们的突变系和杂交系。

TCDD 是多氯联苯化合物及其类似物中毒性最大的一种，具有最强的致腭裂能力。其致畸作用有着显著的时间窗，这个时间窗与器官发育关键时期密切相关。以 C57BL/6J 小鼠为例，在腭突融合前，即妊娠第 9~14 天（gestation day 9~14，GD9~14）给药均能诱导腭裂发生。

TCDD 主要经皮肤黏膜接触摄取，随血液分布至靶器官，能通过胎盘传递给子代。鉴于其化学性质稳定又具有亲脂性，因而将其溶于玉米油等无毒油性介质后，给予明确孕期的孕鼠灌胃是建立胎鼠腭裂模型的理想方法。

相同条件（品系、给药时间、给药途径）下，胎鼠腭裂模型呈现一定范围内的剂量依赖效应，即给药越多，腭裂发生率越高。药物诱导的半数有效剂量 ED_{50} 的单位以 mg/kg 计，数值为 1~500，属临床用量。TCDD 的毒性远大于药物，ED_{50} 的单位以 μg/kg 计，数值约为 20[1]。相对而言，TCDD 诱导腭裂的剂量范围狭窄，并且高剂量下有明显的胚胎致死性，因而剂量控制应更为严格。

2 TCDD 所致胎腭的组织形态学变化

腭组织大体经过腭突垂直生长、舌下降、腭旋转抬升、腭水平再定位、腭突水平生长、腭突接触、腭突融合等一系列连贯的动态过程才能形成正常的腭器官，此过程中任意一阶段出现异常均会导致腭裂。相关的细胞学改变主要涉及胎鼠腭间充质细胞（murine embryonic palate mesenchyme，MEPM）、腭中缝上皮细胞（medial edge epithelium，MEE）。

TCDD 诱发的腭裂，其腭突大小与对照组没有差异，而氢化可的松诱发的腭裂呈现出一种小体积的腭突改变[2]。有趣的是，维甲酸在不同给药时间产生的腭裂形态不同：GD10 诱导时形成小体积的腭突，GD12 诱导时形成正常大小的腭突[3]。尽管最终以腭突间隙为共同腭裂表型，但腭突形态学的差异提示不同化学物质诱导的腭裂机制并不相同。

MEPM 的增殖与腭突的生长相关，曲安奈德能抑制大鼠 MEPM 的增殖[4]，这可能是糖皮质激素诱导产生小体积腭突的细胞基础。地塞米松给药处理的大鼠胚胎表现出上皮细胞体积增大并大量脱屑，随后紊乱的细胞层以角蛋白样特征沉积[5]；曲安奈德诱导大鼠 MEE 向复层鳞状上皮分化，这些复层鳞状 MEE 细胞部分相互融合[4]。这些证据均显示当腭突初步接触时，糖皮质激素能抑制 MEE 细胞凋亡，并使其异常分化从而导致腭裂。

维甲酸诱导的腭突双相改变分别涉及的是：GD10 处理组，腭间充质产生了类似糖皮质激素诱导的生长抑制，MEE细胞并未凋亡而分化成了一种复层鳞状口腔样上皮细胞；GD12 处理组，并不产生生长抑制，但 MEE 细胞分化成一种假复层纤毛鼻腔样上皮细胞[6]。维甲酸通过调控控制细胞周期的分子改变细胞增殖，通过调控 p38MAPK 信号调控凋亡[7]。进一步的 MEE 细胞行为研究显示：腭突融合期间，仅在接触后的前段区域的 MEE 细胞会发生凋亡，腭突接触对于有效激活 MEE 凋亡是必要的。外源性全反式维甲酸增加了与接触无关的 MEE 凋亡，进而影响腭突粘附，因而形成腭裂。

与糖皮质激素诱发的小腭突及维甲酸诱导的双相腭突改变不同的是，TCDD 诱导并不涉及腭突生长受限，但能抑制 MEE 细胞凋亡，并使其分化为口腔样上皮细胞[2]。融合期间 MEE 电镜观察显示：对照组细胞膨大、有丝状伪足；而 TCDD 组丝状伪足减少或消失[8]，且细胞都是扁平的、没有明确边界。异常的 MEE 形态变化促使腭突融合失败，这与腭突在 GD15 接触融合却又在 GD16 分离的组织形态改变一致[9]。双侧腭突融合期间，MEE 自鼻腔面至口腔面产生了不同的转归，部分相互接触后凋亡，部分分化为鼻腔样上皮细胞、口腔样上皮细胞或 MEPM。这些变化过程转瞬即逝，而 MEE 占整个腭组织细胞总数的比例不足 1%。因此，实际观察 MEE 的动态变化存在相当大的困难。学界对于 MEE 的融合期转归也尚无定论。

3 TCDD 诱发胎鼠腭裂的机制探索

腭发育过程中一系列生长因子及受体的动态变化及调控机制是腭裂病因学研究的主要方向之一。这些生长因子在小鼠胚胎发育中发挥重要作用，能调节增殖、分化，共同参与腭发育过程中一系列重大的细胞事件，包括 MEE 增殖的终止，

MEPM细胞外基质蛋白的合成，MEE 的凋亡和 MEE 向MEPM 的转化。

Pratt[10]推测，TCDD 与糖皮质激素诱导产生不同腭突表型的原因是：糖皮质激素受体在 MEPM 中更占优势，而TCDD 作用的受体在 MEE 中更占优势。糖皮质激素通过抑制MEPM 生长而发挥致畸作用，而 TCDD 则改变 MEE 分化。它们的分子基础是，相对于正常腭发育时表皮细胞生长因子（epidermal growth factor，EGF）、表皮细胞生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）、转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）、转化生长因子-β2（transforming growth factor-β2，TGF-β2）的表达出现差异[2]。

对于维甲酸诱导的双相腭突形态来说，其成因可能是 GD10 和 GD12 的转化生长因子-α（transforming growth factor-α，TGF-α）、TGF-β1 的差异表达[11]。正常发育的 MEE 在腭突融合阶段 EGF 下降，随后发生凋亡；然而此时维甲酸却使其维持与 EGFR 结合的 EGF 表达[12]，这可能是维甲酸诱导的腭突不能融合的分子机制。TCDD 与维甲酸联合诱导时同样表现出了双相腭突表型，GD10 联合应用时产生与单独维甲酸诱导类似的表型，GD12 联合应用时产生与单独 TCDD 诱导类似的表型；TCDD 能降低上皮和间充质细胞 EGF、TGF-α、TGF-β1 的表达，GD10 联合应用产生的小腭突可能是这些生长因子大幅下降所致[13]。此外，维甲酸诱发的腭裂还与维甲酸受体相关[14-15]。

TCDD 与氢化可的松联合诱导的实验发现，单独应用 TCDD 使芳香烃受体（aryl hydrocarbon receptor，AhR）下调而糖皮质激素受体（glucocorticoid receptor，GR）上调，单独应用氢化可的松使 GR 下调、AhR 上调，联合应用时均上调；单独诱导时，腭裂发生率均较低，联合应用则能显著提升腭裂发生率[16]。随后的研究显示，TCDD 对胎鼠腭发育的影响似乎取决于反式维甲酸信号通路，该信号通路能控制 AhR 表达[17]。这些证据显示，TCDD 与糖皮质激素以及维甲酸在受体信号通路上存在一定的交叉部分。生长因子基因敲除实验发现：EGF 能促进 TCDD 诱导的腭裂，而 TGF-α 不能[18]；也有结果显示，虽然 EGF 敲除能降低腭裂发生率，但 EGF 和 TGF-α 双敲除后在高剂量（50、100、150 μg/kg）TCDD 诱导下较野生型提高了腭裂发生率[19]，故不能认为 EGF 是 TCDD 诱导腭裂的促进因素。体外腭培养模型发现，加入转化生长因子-β3（transforming growth factor-β3，TGF-β3）可以防止 TCDD 诱导的丝状伪足减少，并完全阻止 TCDD 诱导的腭突不融合[8]。也有结果表明，高剂量 TCDD 暴露下的胎鼠腭组织在 GD14.5（融合期间）表达出较正常显著升高的 TGF-β3[20]，因而 TGF-β3 的作用也存在争议。

4 TCDD 致胎鼠腭裂作用的增强与拮抗

糖皮质激素、维甲酸等具有明确致腭裂作用的物质能增强 TCDD 的致腭裂能力。此外，还存在一些本身并不致畸却能加强 TCDD 致畸作用的因素。例如，单独应用甲状腺素 T3/T4 会产生极低的腭裂发生率，但当它们中的任一种与 TCDD 联合应用时可以产生较单独应用 TCDD 更高的腭裂发生率[21]，提示 TCDD 致畸性也受体内其他激素的影响。

多种因素均能在一定程度上拮抗胚胎致畸性，但都不完全。其中某些拮抗效应针对的是腭裂病因中的已知机制，一定程度上也验证了这些机制。例如：α-萘黄酮（alpha-naphthoflavone）[22]与白藜芦醇（resveratrol）[23]可能通过抑制 AhR 而发挥拮抗 TCDD 的致畸作用。叶酸 5 mg/kg 能拮抗 TCDD 24 μg/kg 的致腭裂效应[1]，这可能与甲基基团的体内代谢相关。

5 结论与讨论

体外腭器官培养实验显示[24]，小鼠胚胎腭器官形成发生在 GD14 前后。GD13 及之前是腭融合前期，双侧腭突经历一个细胞增生、体积增大的变化；GD13~14 是腭融合期，双侧腭突接触并相互融合形成腭中缝；GD15~17 是腭融合后期，融合的腭继续生长并矿化。前期体内实验[25]提示 TCDD 主要通过破坏腭融合而产生腭裂表型，说明双侧腭突的 MEE 接触是受到干扰的，而此后 MEE 的转归包括凋亡、分化目前尚无定论。双侧腭突形态大小与正常发育的腭突等同，说明腭组织细胞的增生并未受到明显影响。TCDD、糖皮质激素、维甲酸等这些能明确诱发胎鼠腭裂的化学物质在腭裂发病上存在共通性，体内物质代谢研究能为这种共通性提供线索。

腭融合是一个短暂而又复杂的过程，涉及许多分子信号的精密调控，在整个腭器官形成中构成时空特异的表达。融合前、融合中、融合后，某些信号分子表达并不一致，并且在不同的腭组织细胞中、细胞外基质中表达也有差异，这是因为它们有自己固定的表达模式。TCDD 等致畸物质正是通过破坏这些时空特异的表达模式而阻碍腭的正常发育过程。因而不能在研究单一信号分子时只定位于单一的位置、单一的时间点。体内外实验、特别是体内实验，目前尚不能很好地分离不同类型的腭组织细胞，因而阻碍了研究的进展。表观遗传调控研究，包括 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化[25-26]等，能为这一动态过程的时空特异性提供良好的解释，但目前研究水平仍较浅，需要在染色体、基因定位的维度对特定信号分子的表达模式变化深入研究。

就目前的资料而言，虽然腭器官培养的实验技术基本完善，但尚未见 TCDD 诱导胎鼠腭器官培养的报道。体内实验相对于体外实验而言会受到包括孕鼠状态等不可控因素的干扰，并且单一胎腭一旦离体就失去了连续动态观察的可能。因此，在分子信号通路、拮抗机制的研究中，体外实验有着“先天优势”。由于腭融合期的腭组织细胞处于一个非常活跃且不稳定的状态，尚无商品化的细胞产品可以用于实验研究。动物胚胎来源的腭组织细胞中，MEE 的比例经分离后不能达到细胞总数的 1%，通过原代培养的方式研究 TCDD 对 MEE 的影响具有一定难度。因此，将融合前的腭器官作为整体进行离体培养，通过 TCDD 诱导成模将是体外实验的重要环节。此外，人类胚胎用于实验研究不得不面对伦理困境，同

时缺乏人源性腭组织细胞的验证也阻碍了动物实验研究结果向临床应用转化。因此，实验技术和条件的变革对于本领域的研究进展显得愈加迫切。

参 考 文 献

[1] Li CH, Shi B, He W, et al. Is it possible to antagonize 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin- induced cleft palate by prenatal administration of folic acid?An experimental study[J]. Toxicol Ind Health, 2010, 26(5): 281-286.

[2] Abbott BD, Harris MW, Birnbaum LS. Comparisons of the effects of TCDD and hydrocortisone on growth factor expression provide insight into their interaction in the embryonic mouse palate[J]. Teratology, 1992, 45(1): 35-53.

[3] Abbott BD, Birnbaum LS. Cellular alterations and enhanced induction of cleft palate after coadministration of retinoic acid and TCDD [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1989, 99(2): 287-301.

[4] Furukawa S, Usuda K, Abe M, et al. Histopathological findings of cleft palate in rat embryos induced by triamcinolone acetonide[J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(4): 397-402.

[5] Bittencourt MA, Bolognese AM. Epithelial alterations of secondary palate formation[J]. Braz Dent J, 2000, 11(2): 117-126.

[6] Abbott BD, Harris MW, Birnbaum LS. Etiology of retinoic acid-induced cleft palate varies with the embryonic stage[J]. Teratology, 1989, 40(6): 533-553.

[7] Cuervo R, Valencia C, Chandraratna RA, et al. Programmed cell death is required for palate shelf fusion and is regulated by retinoic acid[J]. Dev Biol, 2002, 245(1): 145-156.

[8] Thomae TL, Stevens EA, Bradfield CA. Transforming growth factor-beta3 restores fusion in palatal shelves exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin[J]. J Biol Chem, 2005, 280(13): 12742-12746.

[9] Fujiwara K, Yamada T, Mishima K, et al. Morphological and immunohistochemical studies on cleft palates induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice[J]. Congenit Anom (Kyoto), 2008, 48 (2): 68-73.

[10] Pratt RM. Receptor-dependent mechanisms of glucocorticoid and dioxin-induced cleft palate[J]. Environ Health Perspect, 1985, 61: 35-40.

[11] Abbott BD, Birnbaum LS. Retinoic acid-induced alterations in the expression of growth factors in embryonic mouse palatal shelves[J]. Teratology, 1990, 42(6): 597-610.

[12] Abbott BD, Pratt RM. Retinoic acid alters epithelial differentiation during palatogenesis[J]. J Craniofac Genet Dev Biol, 1991, 11(4): 315-325.

[13] Abbott BD, Birnbaum LS. TCDD-induced altered expression of growth factors may have a role in producing cleft palate and enhancing the incidence of clefts after coadministration of retinoic acid and TCDD [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1990, 106(3): 418-432.

[14] Naitoh H, Mori C, Nishimura Y, et al. Altered expression of retinoic acid(RA) receptor mRNAs in the fetal mouse secondary palate by all-trans and 13-cis RAs: implications for RA-induced teratogenesis[J]. J Craniofac Genet Dev Biol, 1998, 18(4): 202-210.

[15] Nugent P, Sucov HM, Pisano MM, et al. The role of RXR-alpha in retinoic acid-induced cleft palate as assessed with the RXR-alpha knockout mouse[J]. Int J Dev Biol, 1999, 43(6): 567-570.

[16] Abbott BD, Perdew GH, Buckalew AR, et al. Interactive regulation of Ah and glucocorticoid receptors in the synergistic induction of cleft palate by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and hydrocortisone[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1994, 128(1): 138-150.

[17] Jacobs H, Dennefeld C, Feret B, et al. Retinoic acid drives aryl hydrocarbon receptor expression and is instrumental to dioxin-induced toxicity during palate development[J]. Environ Health Perspect, 2011, 119(11): 1590-1595.

[18] Bryant PL, Schmid JE, Fenton SE, et al. Teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) in mice lacking the expression of EGF and/or TGF-alpha[J]. Toxicol Sci, 2001, 62(1): 103-114.

[19] Abbott BD, Buckalew AR, DeVito MJ, et al. EGF and TGF-alpha expression influence the developmental toxicity of TCDD: dose response and AhR phenotype in EGF, TGF-alpha, and EGF+TGF-alpha knockout mice[J]. Toxicol Sci, 2003, 71(1): 84-95.

[20] Gan LQ, Fu YX, Liu X, et al. Transforming growth factor-beta3 expression up-regulates on cleft palates induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice[J]. Toxicol Ind Health, 2009, 25(7): 473-478.

[21] Lamb JC 4th, Harris MW, McKinney JD, et al. Effects of thyroid hormones on the induction of cleft palate by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in C57BL/6N mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1986, 84(1): 115-124.

[22] Jang JY, Shin S, Choi BI, et al. Antiteratogenic effects of alpha-naphthoflavone on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposed mice in utero[J]. Reprod Toxicol, 2007, 24(3-4): 303-309.

[23] Jang JY, Park D, Shin S, et al. Antiteratogenic effect of resveratrol in mice exposed in utero to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 591(1-3): 280-283.

[24] Shiota K, Kosazuma T, Klug S, et al. Development of the fetal mouse palate in suspension organ culture[J]. Acta Anat, 1990, 137(1): 59-64.

[25] 王 晨，袁心刚，傅跃先，等. TCDD 诱导的胎鼠腭发育过程中 DNA 甲基化变化[J]. 中华整形外科杂志，2016，32(5)：362-367.

[26] 刘翠苹，袁心刚，傅跃先，等. 组蛋白 H3 乙酰化在 TCDD 致胎鼠腭裂发生中的作用[J]. 中华整形外科杂志，2014，30(5)：369-373.

（责任编辑：冉明会）