

· 论 著 ·

小鼠胚胎腭突融合过程中 IRF6 蛋白在腭突组织中表达的实验研究*

周 容, 陈秀娟, 肖文林[△], 钟 凤

(青岛大学医学院附属医院口腔科, 山东青岛 266071)

摘要:目的 观察小鼠胚胎腭突融合过程中 IRF6 蛋白在腭突组织中的表达情况, 探讨唇腭裂发生原因。方法 60 只 C57BL/6J 近交系受孕小鼠分别于妊娠第 13.0 天(GD13.0)、GD14.0、GD14.5 及 GD15.0 时断颈处死, 取小鼠胚头经固定、石蜡包埋、切片, 行苏木素-伊红染色及免疫组织化学检测不同胚胎发育时期的腭突组织中 IRF6 蛋白的表达。结果 GD13.0 时, 腭突上皮、舌上皮可见 IRF6 蛋白表达; GD14.5 时, 腭突中嵴上皮接触, IRF6 蛋白的表达水平达到高峰; GD15.0 时, 表达水平下降 ($P < 0.05$)。结论 IRF6 蛋白在两侧腭胚突的接触、融合期发挥调节作用。

关键词: 胚胎发育; 小鼠, 近交系; 腭裂; 干扰素调节因子 6; 腭突融合

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.02.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)02-0124-03

Experimental study of IRF6 protein expression in palatal tissues during embryonic palatine process fusion in mice*

Zhou Rong, Chen Xiujuan, Xiao Wenlin[△], Zhong Feng

(Department of Stomatology, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao

University, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract: Objective To observe IRF6 protein expression in palatal tissues during mice embryonic palatine process fusion and to explore pathogenesis of cleft lip and palate. **Methods** Sixty C57BL/6J inbred and conceive mice were sacrificed by having their necks broken on gestation day 13.0(GD13.0), GD14.0, GD14.5 and GD15.0. The mice embryo heads were fixed, paraffin embedded, coronal sectioned. Hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry were performed to detect IRF6 protein expression in palatal tissues in different embryonic development period. **Results** IRF6 protein expression was found in palatine process epithelia, tongue epithelia on GD13.0, and reached the peak on GD14.5 when the palatal medial edge epithelia contacted, and decreased on GD15.0 ($P < 0.05$). **Conclusion** IRF6 protein play a regulatory role in periods of bilateral palatine process contact and fusion.

Key words: embryonic development; mice, inbred strains; cleft palate; interferon regulatory factor 6; palatine process fusion

唇腭裂是一种临床常见的先天缺陷性疾病, 据国内统计数据^[1]显示, 唇腭裂总体患病率为 16.63/10 000。自 20 世纪 40 年代以来, 人们发现人类唇腭裂的发生有明显家族聚集性, 认为唇腭裂的发生受遗传因素影响。目前国、内外许多学者的研究证实了唇腭裂的发病与基因密切相关。随着流行病学与分子遗传学的发展, 一些与唇腭裂发生相关的基因陆续被发现。采用动物实验对易感基因的功能进行检测, 是揭示遗传性疾病病因和发病机制的主要方法。干扰素调节因子 6(interferon regulatory factor-6, IRF-6) 基因定位于 1q32~41^[2], 由 10 个外显子组成, 第 1、10 外显子及部分第 9 外显子不转译, 由 467 个氨基酸组成。研究表明人和小鼠胚胎发育期的毛囊、皮肤、生殖器、牙蕾及腭部组织均有 IRF6 基因的表达, 与包括腭在内的多个器官的胚胎发育有关。IRF6 基因是迄今发现的、最具价值的唇腭裂发病相关基因^[3]。研究证明 IRF6 基因在两侧腭胚突的接触期、黏附融合期发挥调节作用, IRF6 基因突变将影响腭突中嵴上皮细胞的凋亡或腭中嵴上皮向间充质的转化^[4]。但腭的发育经历了生成、上抬、水平生长靠近及腭中嵴靠近融合的过程。在此过程中 IRF6 蛋白在组织中的表达情况尚不清楚。本实验研究了 C57BL/6J 小鼠胚胎腭突在融合过程中 IRF6 蛋白的表达情况。为后续 IRF6 基因参与影响腭突融合的信号转导通路的研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 IRF6 单克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品, 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠第二抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。主要仪器包括 NUAIRE-600E 超净工作台(美国)、SANYO 超低温冰箱(日本)、Millipore 超纯水/纯水系统(美国)、OLYMPUS 双目手术显微镜(日本)等。

1.2 动物及取材 健康 C57BL/6J 近交系小鼠购自中国医学科学院医学实验动物研究所, 8~10 周龄。将小鼠于 8:00 pm 按雌雄 2:1 的比例合笼交配, 第 2 日 8:00 am 检查雌鼠阴道内精液形成的阴栓, 阴栓阳性者定为妊娠第 0 天(gestation day 0, GD0), 共获得 60 只受孕小鼠。将 GD13.0 的 C57BL/6J 小鼠断颈处死, 用 75% 乙醇浸泡 1 min; 无菌条件下取出胚胎, 眼科剪下小鼠胚头, 放入无菌的无钙镁磷酸盐缓冲液中, 洗涤 3 次。依次剪取 GD14.0、GD14.5、GD15.0 的小鼠胚头。

1.3 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色 不同时间段的胚头经 4% 多聚甲醛固定后, 常规石蜡包埋; 冠状位切片, 切片厚 4 μm; 常规用二甲苯脱蜡, 梯度乙醇至水化; 苏木素染色 10 min, 自来水冲洗; 盐酸乙醇分化 30 s。1% 氨水返蓝 30 s, 自来水冲洗 10 min; 置于伊红液中 2 min; 常规脱水、透明、中性树脂封固。实验重复 3 次。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助(81070817); 青岛市科技计划项目资助(08-2-1-5)。作者简介: 周容(1984~), 硕士研究生, 主要从事先天性唇腭裂的基础研究及临床工作。△ 通讯作者, Tel: 18661806029; E-mail: wenlinxiao@sina.com。

1.4 免疫组织化学检测 利用 IRF6 单克隆抗体鉴定腭突上皮细胞特异性抗原的表达。取 GD13.0、14.0、14.5、15.0 的小鼠胚头，经 4% 多聚甲醛固定，石蜡切片脱蜡至水。3% H₂O₂ 室温孵育 30 min，磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBS) 浸泡，5 min×3 次；正常兔血清封闭，室温孵育 1 h，倾去血清，勿洗；滴加适当比例稀释的第一抗体，4℃ 过夜，PBS 冲洗，5 min×3 次；滴加适当比例稀释的第二抗体，室温孵育 1 h，PBS 冲洗，5 min×3 次；二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色；自来水充分冲洗，复染，封片。

1.5 阳性细胞计数 用网格测试法在高倍镜视野下计数每个时间点标本腭突中全部间充质细胞的阳性细胞数，由此获得腭突间充质细胞 IRF6 蛋白表达的阳性指数，阳性指数=阳性细胞数总数/高倍镜视野内细胞总数×100%，每例选择 5 个高倍镜视野。

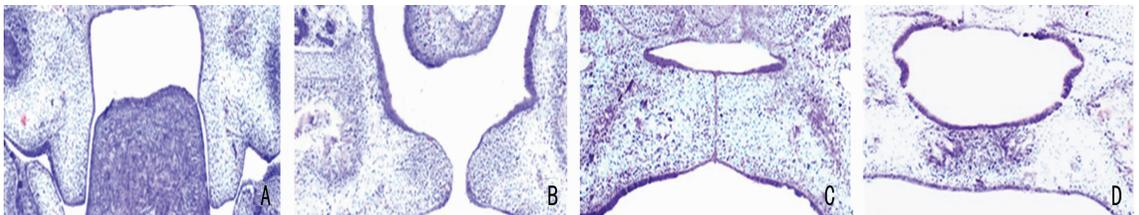
1.6 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析，计

量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 *t* 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

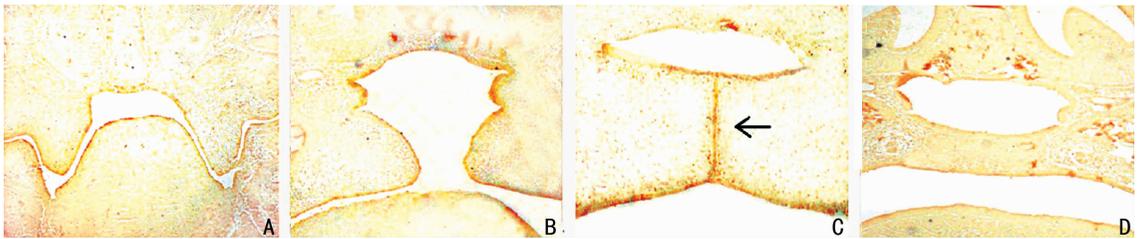
2.1 不同胚胎发育时期的腭突位置 GD13.0 时，腭突为垂直向生长，腭突位于舌体的两侧；GD14.0 时，腭突上抬，转为水平方向，腭突位于舌体的上方；GD14.5 时，双侧腭突水平方向生长接触，仍可见腭中嵴上皮；GD15.0 时，腭中嵴上皮消失，腭突融合，见图 1。

2.2 不同胚胎发育时期的腭突组织中 IRF6 蛋白表达 GD13.0 时，腭突上皮、舌上皮可见 IRF6 蛋白表达；GD14.0 时，上述部位 IRF6 蛋白表达增强；GD14.5 时，腭突中嵴上皮接触，IRF6 蛋白的表达水平达到高峰，与其他发育时期比较，其表达水平的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；GD15.0 时，腭突融合，中嵴上皮消失，腭的鼻腔面及口腔面上皮仍可见 IRF6 蛋白表达，但表达水平下降 ($P < 0.05$)，见图 2、表 1。



A:GD13.0;B:GD14.0;C:GD14.5;D:GD15.0。

图 1 不同胚胎发育期的腭突位置(HE 染色 ×40)



A:GD13.0;B:GD14.0;C:GD14.5,箭头所示为腭突中嵴上皮接触,IRF6 蛋白表达水平达到高峰;D:GD15.0。

图 2 不同胚胎发育期腭突组织中 IRF6 蛋白的表达(免疫组织化学 ×40)。

表 1 不同胚胎发育期腭突组织 IRF6 蛋白的表达

胚胎发育期	n	阳性细胞数(个)	阳性指数
GD13.0	15	32.7±3.1	0.33
GD14.0	15	40.1±2.1	0.40
GD14.5	15	46.0±3.2	0.46
GD15.0	15	13.5±3.5	0.14

3 讨 论

IRF6 基因最早是在研究 Van der Woude 综合征时被人们发现的，它位于染色体 1q32~41，有 10 个外显子，2 个保守区，1 个侧翼(螺旋 DNA 结合域)和一个被称为 SMIR(Smad-interferon regulatory factor)的蛋白质结合域^[5-6]。对于不同种族的先天性唇腭裂患者，临床遗传学研究已经发现了多个 IRF6 基因的突变位点，相继有学者对此进行了不同种族和地域人群唇腭裂(包括综合征性与非综合征性唇腭裂)的 IRF6 基因多态性的研究，发现突变包括无义突变、错义突变、移码突变或缺失突变。IRF1、IRF2、IRF3、IRF4、IRF5、IRF7、IRF8 或 IRF9 基因敲除的小鼠表现出免疫反应缺陷，但并不发生胚胎发育畸

形。而最近发育生物学研究发现，IRF6 基因敲除小鼠的表型出现包括腭裂在内的颅颜发育畸形。遗传学研究发现人类 IRF6 基因突变可发生 Van der Woude 综合征，并且指出这是非综合征性唇腭裂发生的重要遗传因素。研究发现约 12% 非综合征性唇腭裂患者与 IRF6 基因突变有关^[3]。

在研究 Van der Woude 综合征的遗传模式时人们发现，IRF6 基因的蛋白结合区域 274(V274I)存在一个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点，该位点的变异使其编码的氨基酸序列中异亮氨酸被缬氨酸替代。该变异可影响基因功能，导致唇腭裂的发生^[7]。多位学者陆续对意大利、美国、比利时以及中国台湾地区人群进行研究，同样发现了 IRF6 基因的多个 SNP 位点(rs2013162、rs2235375、rs2235373、rs2235371)，与非综合征性唇腭裂之间存在显著相关性^[8-11]。Knight 等^[12]研究了 IRF6 基因在小鼠和禽类面部发育期间的表达，他们发现在小鼠次发腭融合期间腭胚突中嵴上皮有 IRF6 基因的表达，同时发现敲除转化生长因子 β3(transforming growth factor β3, TGF-β3)基因的小鼠出现了包括腭裂在内的多发畸形，在胚胎未融合腭胚突的中嵴上皮中 IRF6 基因表达下降。Richardson 等^[4]通过小鼠试验证实了在胚

胎上皮发育过程中, *IRF6* 基因是角质形成、细胞增殖与分化的关键因素, 与部分基因突变所致的表型有重叠现象^[13-15]。

研究还发现, 在胚胎腭融合过程中, 腭突中线边缘的 *IRF6* 基因均呈高水平表达^[3,7]。GD11~14 是腭突发育的关键期, 此阶段发生舌的下降、双侧腭板的上抬、粘连、融合等一系列复杂事件, 上述任一事件受到干扰, 如腭突生长缺陷、腭突上抬延迟或失败、腭突融合、腭中嵴上皮细胞死亡、间充质固化和分化过程失败等, 均会导致腭裂的发生^[8]。

本研究应用 C57BL/6J 近交系小鼠, 依次剪取 GD13.0、GD14.0、GD14.5 及 GD15.0 时的胚头, 经免疫组织化学检测后, 用网格测试法在高倍镜视野下计数腭突中全部间充质细胞的阳性细胞数。结果发现, GD13.0 时, 腭突上皮可见 *IRF6* 蛋白的表达; GD14.5 时, 腭突上皮中 *IRF6* 蛋白表达达到高峰; GD15.0 时, 腭突融合后, 仅在腭突的口腔面及鼻腔面的上皮细胞中可见 *IRF6* 蛋白表达。本研究证明了在小鼠次发腭融合期间, *IRF6* 蛋白在腭中嵴上皮细胞中持续表达。在腭突融合前的接触期, *IRF6* 蛋白表达水平达到高峰; 在腭突融合后, *IRF6* 蛋白表达水平下降。表明 *IRF6* 蛋白在两侧腭胚突的接触期及黏附融合期发挥调节作用, *IRF6* 蛋白在胚胎腭突中嵴上皮细胞的凋亡或腭中嵴上皮向间充质的转化过程中发挥作用。

研究通过在腭突融合过程中对 *IRF6* 蛋白表达情况的动态检测, 证明其在腭突融合过程中具有重要作用。证实了 *IRF6* 基因是一个重要的先天性唇腭裂候选基因, *IRF6* 基因突变可能会导致腭裂的发生, 为进一步了解并明确腭裂的发生机制提供理论依据, 以后 *IRF6* 基因或可作为孕前筛查的标志, 从而针对唇腭裂高危人群进行早期诊断和干预性预防, 具有重要意义。

参考文献:

- [1] Dai L, Zhu J, Mao M, et al. Time trends in oral clefts in Chinese newborns; dtoring Network[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010, 88(1): 41-47.
- [2] Schutte BC, Bjork BC, Coppage KB, et al. A preliminary gene map for the Van der Woude syndrome critical region derived from 900 kb of genomic sequence at 1q32-q41[J]. Genome Res, 2000, 10(1): 81-94.
- [3] Ingraham CR, Kinoshita A, Kondo S, et al. Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (*Irf6*) [J]. Nat Genet, 2006, 38(11): 1335-1340.
- [4] Richardson RJ, Dixon J, Malhotra S, et al. *Irf6* is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation Switch[J]. Nat Genet, 2006, 38(11): 1329-1334.
- [5] Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, et al. Mutations in *IRF6* cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes[J]. Nat Genet, 2002, 32(2): 285-289.
- [6] Eroshkin A, Mushegian A. Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens[J]. J Mol Med, 1999, 77(5): 403-405.
- [7] Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, et al. Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate[J]. N Engl J Med, 2004, 351(8): 769-780.
- [8] Luca S, Palmieri A, Martinelli M, et al. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the *IRF6* locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population[J]. Am J Hum Genet, 2005, 76(1): 180-183.
- [9] Blanton SH, Cortez A, Stal S, et al. Variation in *IRF6* contributes to nonsyndromic cleft lip and palate[J]. Am J Med Genet, 2005, 137(3): 259-262.
- [10] Ghassibe M, Bayet B. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population[J]. Eur J Hum Genet, 2005, 13(11): 1239-1242.
- [11] Park JW, McIntosh I, Hetmanski JB, et al. Association between *IRF6* and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations[J]. Genet Med, 2007, 9(4): 219-227.
- [12] Knight AS, Schutte BC, Jiang R, et al. Developmental expression analysis of the mouse and chick orthologues of *IRF6*; the gene mutated in Van der Woude syndrome[J]. Dev Dyn, 2006, 235(5): 1441-1447.
- [13] Moretti F, Marinari B, Lo Iacono N, et al. A regulatory feedback loop involving p63 and *IRF6* links the pathogenesis of 2 genetically different human ectodermal dysplasias[J]. J Clin Invest, 2010, 120(5): 1570-1577.
- [14] Thomason HA, Zhou H, Kouwenhoven EN, et al. Cooperation between the transcription factors p63 and *IRF6* is essential to prevent cleft palate in mice[J]. J Clin Invest, 2010, 120(5): 1561-1569.
- [15] Rahimov F, Marazita ML, Visel A, et al. Disruption of an AP-2alpha binding site in an *IRF6* enhancer is associated with cleft lip[J]. Nat Genet, 2008, 40(11): 1341-1347.

(收稿日期: 2012-10-15 修回日期: 2012-11-25)

(上接第 123 页)

vascular endothelial cells. Implications for the aging heart [J]. J Physiol Pharmacol, 2011, 62(5): 583-587.

- [13] Wang S, Song P, Zou MH. AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases[J]. Clin Sci (Lond), 2012, 122(12): 555-573.
- [14] Dailey MJ, Kim S. Inositol polyphosphate multikinase: an

emerging player for the central action of AMP-activated protein kinase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 421(1): 1-3.

- [15] Razeghi P, Taegtmeier H. Cardiac remodeling: UPS lost in transit [J]. Circ Res, 2005, 97(10): 964-966.

(收稿日期: 2012-08-13 修回日期: 2012-10-18)