

# 细胞凋亡与腭裂发生关系的实验研究

黄洪章, 陈亦阳

(中山医科大学口腔医学院口腔颌面外科, 广东 广州 510055)

**摘要:**【目的】探讨由地塞米松(dexamethasone, DEX)诱导的腭裂胚胎模型的腭裂形成中细胞凋亡的意义与作用。【方法】给 12 孕期日(gestation day, GD)的昆明小白鼠腹腔注射 10~50 mg/kg 剂量的 DEX, 获取腭裂胚胎模型。对标本标准颅颌冠状切片进行辣根过氧化物酶标亲核素-生物素-dUTP 原位末端标记法(ISEL), 在光镜及电镜下做形态学定性观察及腭突凋亡细胞计数分析。【结果】实验组均观察到 ISEL 阳性细胞, 其计数均数及腭裂发生率分别与 DEX 剂量呈正相关( $r = 0.9911/0.9978$ )。【结论】DEX 诱导的腭裂与腭突细胞凋亡水平升高有关。

关键词: 细胞凋亡; 腭裂 / 病理学; 疾病模型, 动物

中图分类号: Q132.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04-0245-03

## Experimental Study On Relationship Between Apoptosis and Cleft Palate

HUANG Hong-zhang, CHEN Yi-yang

(Department of Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510055, China)

**Abstract:**【Objective】To explore significance and effect of apoptosis in forming mechanism of cleft palate induced by dexamethasone (DEX).【Methods】In order to get cleft palate mouse embryo model, a series of doses from 10 to 50 mg/kg DEX were injected intraperitoneally into Kunming mice at 12th gestation day (GD). The cranio-maxillary sections of samples were labeled by HRP-avidin-biotin-dUTP in situ end labeling (ISEL) and were observed morphologically and quantitatively under light microscope and electron microscope.【Results】The ISEL positive cells were found in treatment groups. The means of sums and cleft palate incidence have positive correlation with the doses of DEX ( $r = 0.9911/0.9978$ ).【Conclusions】There is a relationship between increasing level of apoptosis and development of cleft palates induced by DEX.

**Key words:** apoptosis; cleft palate/pathology; disease model, animal

细胞凋亡(apoptosis)是指有核细胞在一定条件下,通过其自身内部机制而发生的细胞自杀过程。它广泛存在于胚胎发育、形态发生等过程中。有学者认为腭裂的发生与腭突细胞凋亡水平的改变有关,而皮质类固醇是控制凋亡水平的重要物质之一<sup>[1]</sup>。本研究采用地塞米松(dexamethasone, DEX)诱导小鼠腭裂,应用辣根过氧化物酶标亲核素-生物素-dUTP 原位末端标记法(ISEL)标记腭突中的凋亡细胞,通过细胞计数分析腭突细胞凋亡水平与 DEX 给药剂量的关系,并探讨其在腭裂发

生机理中的作用。

### 1 材料和方法

实验动物选用(40±2)g 的 8~10 周龄昆明小白鼠。随机分为 6 组,每组各 5 只。雌雄合笼 1:1 交配,发现阴栓定为孕期第一天(1 GD, the first gestation day, 以下类推)。于 12 GD 分别给 1~5 组孕鼠腹腔注射剂量为 10, 20, 30, 40, 50 mg/kg 的 DEX; 0 组为对照组。各组均在 15.5 GD 断颈处

收稿日期: 2000-03-08

基金项目: 湖北省人事厅留学回国人员科研启动基金

作者简介: 黄洪章(1952-)男,广东潮阳人,教授,博士生导师

死,立即取出胚鼠,选取有腭裂畸形者作标本。剪取胚鼠头部,浸入4℃ Carnoy's 固定液中6h,直接入体积分数为95%乙醇脱水,常规石蜡包埋。5 $\mu$ m连续颅颌冠状切片至麦克尔软骨处。标本按如下步骤依次处理<sup>3</sup>:切片用二甲苯脱蜡,逐级乙醇水化;置2 $\times$ SSC液中,80℃,20min;蒸馏水冲洗;胃蛋白酶消化60min,不时摇动,流水冲洗终止反应;含BSA的缓冲液漂洗5min;滴加标记液50 $\mu$ l,置湿盒内,25℃,1h;PBS漂洗;置内源酶阻断剂(体积分数0.1% $H_2O_2$ )中15min;PBS漂洗;湿盒内用HRP-avidin点片,室温30min;PBS漂洗;DAB- $H_2O_2$ 显色,流水冲洗,常规封片。切片在光

镜下观察腭突(以其基部上皮转折处连线为界)细胞凋亡发生部位并计数。数据经统计学处理分析。常规制作透射电镜标本并于日立H-600透射电镜(日本)下观察。

## 2 结果

### 2.1 致畸情况

实验组腭裂发生率与DEX给药剂量呈正相关,相关系数 $r=0.9978$ 。胎鼠不统计其他并发畸形。对照组未发现腭裂产生(表1)。

### 2.2 ISEL光镜观察

表1 腭裂发生率与DEX给药剂量的关系

Table 1 Relationship between cleft palate(CP) incidence and doses of DEX

Groups	Dose (mg/kg)	CP embryo mice	Normal and CP embryo mice	CP incidence (%)
0	0	0	63	0
1	10	17	65	26.15
2	20	22	59	37.28
3	30	29	62	46.77
4	40	30	55	54.55
5	50	38	60	63.33

凋亡细胞胞核在光镜下呈ISEL的棕褐色着色,核浆比增大(图1,见附页I)。由于DNA碎片的外泄,部分胞浆也呈阳性着色。凋亡细胞在组织中散在分布,且大多数分布于间质。低倍镜下见腭突发育不足,裂隙宽,呈腭突瘦小(small palatal shelf)样腭裂。

### 2.3 凋亡细胞的透射电镜观察

凋亡细胞的膜结构完整,染色质浓聚于核周呈新月状或块状小体,甚至形成核碎片。其邻近核孔消失(图2,见附页I)。胞浆内线粒体仍保持完整,形态正常;高尔基体、内质网等细胞器由于先行形成凋亡小体而释放至胞外。

### 2.4 凋亡细胞ISEL光镜计数统计

凋亡细胞计数在实验组随着DEX给药剂量提高而增加,呈统计正相关,相关系数 $r=0.9911$ (表2)。在对照组计数并不为零,其均数为11.56,与实验组1组均数17.25相比,具有统计学显著性差异( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

表2 腭突凋亡细胞均数与DEX给药剂量的关系

Table 2 Relationship between means of sums and doses of DEX

Groups	Dose(mg/kg)	Apoptotic means(%)
0	0	11.56
1	10	17.25
2	20	22.70
3	30	27.30
4	40	41.40
5	50	63.25

点提出的概念。它指有核细胞在一定条件下,通过启动其自身内部机制,主要是通过内源DNA内切酶激活而发生的细胞自杀死亡的过程。它是生物体对自身所处环境的某种特定因素而产生的一种应答,是程序控制的死亡形式,又称程序化细胞死亡(programmed cell death,PCD)。PCD具有普遍的生物学意义,它与有丝分裂一起调节细胞群体,使之相对恒定。

在胚胎发育和形态发生中均存在细胞的凋亡,而凋亡模式的改变,往往导致畸形的发生<sup>[4]</sup>。在颅

细胞凋亡是1972年Kerr等<sup>3</sup>根据形态学特

面发育中,新生细胞建立联系是由细胞迁移、诱导、生长及 PCD 实现的。这些联系又由两组调节分子(生长因子 EGF、TGF 和所谓类固醇/甲状腺素/维甲酸超家族(supper family)所操纵的。原发腭和继发腭形成机理方面,如生长、形态发育、融合结合现象,也是如此<sup>[1]</sup>。

本实验采用皮质类固醇药物地塞米松(DEX)诱导小鼠腭裂,不但腭裂发生率同 DEX 给药剂量呈正相关,而且各实验组胚鼠腭突凋亡细胞计数也与 DEX 给药剂量呈正相关。这提示在糖皮质激素类药物 DEX 作用下,腭突凋亡细胞计数水平和腭裂发生存在某种内在的联系。糖皮质激素作为一种体外凋亡诱导剂可诱导昆虫与两栖类动物的变态、哺乳动物的胚胎发育、完全发育器官的萎缩中的凋亡过程<sup>[4]</sup>。糖皮质激素如何通过其受体途径激活凋亡相关基因,目前不十分清楚。糖皮质激素类药物诱导腭裂的机理很复杂<sup>[5]</sup>。Abbott 等<sup>[6-7]</sup>认为糖皮质激素可通过改变胚鼠腭部特定区域生长因子水平影响腭部某些细胞 PCD 水平,并因此产生腭突瘦小并导致腭裂。在本实验中,腭裂胚鼠均表现为腭突发育不足,出现腭突瘦小,与文献报道一致<sup>[6-8]</sup>。这提示糖皮质激素诱导腭裂的机理是产生发育不充分的腭突瘦小,以致没有足够的组织生长至中线并互相融合。Lee<sup>[9]</sup>和 Tamagawa 等<sup>[10]</sup>在研究中发现,细胞凋亡发生在中胚层时,可抑制软骨形成,而发生在外胚层时则不然。本实验通过组织切片 ISEL 光镜下观察,发现在 15.5 GD 时,凋亡细胞大多数分布在腭突间充质,分布在上皮者较少。尽管对照组也存在一定水平的细胞凋亡,但与实验组水平存在统计学显著性差异( $P < 0.05$ )。这提示腭突间充质细胞凋亡水平的上升,是抑制腭突生长、产生腭突瘦小并导致腭裂的重要原因之一。

在颅面发育过程中,细胞群体内细胞的迁移、诱导、增殖及凋亡的变化是错综复杂的。由于胚胎在发育、细胞群体在增大,细胞的增殖处于主导地位,凋亡则处于辅助地位;具体到某一结构的形成,凋亡可能只是在局部活跃。对腭的发育来说,腭突发育期间充质细胞凋亡水平上升可使腭突发育不足,形成腭突瘦小,双侧腭突没有接触;腭突融合

时期中线上皮细胞凋亡水平过低则可使中线上皮持续存在,阻止双侧腭突的融合,或发生融合后的破裂。凋亡作为基本的细胞生物学行为之一,在先天性腭裂发生机理中的作用,值得我们进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Johnston M C, Bronsky P T. Prenatal craniofacial development: new insight on normal and abnormal mechanisms[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1995, 6(1): 25.
- [2] Wijnsman J H, Jonker R R, Kenjzer R, et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA[J]. J Histochem Cytochem, 1993, 4(1): 7.
- [3] Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(2): 239.
- [4] Kaminski M. Processes of cell necrosis-apoptosis and their modification by toxic substances[J]. Med Pr, 1994, 45(3): 267.
- [5] 陈亦阳. 化学药物诱导小鼠腭裂模型的机理(综述)[J]. 国外医学口腔医学分册, 1997, 24(5): 77.
- [6] Abbott B D, Harris M W, Birnbaum L S. 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.
- [7] Abbott B D, Birnbaum L S. TCDD-induced altered expression of growth factors may have a role in producing cleft palate and enhancing the incidence of cleft after coadministration of retinoic acid and TCDD[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1990, 106(3): 418.
- [8] 傅豫川, 李祖兵, 黄洪章. 糖胺多糖含量在腭裂发生机制中的意义[J]. 中华口腔医学杂志, 1997, 32(1): 43.
- [9] Lee K K, Li F C, Yung W T, et al. Influence of digits, ectoderm, and retinoic acid on chondrogenesis by mouse interdigital mesoderm in culture[J]. Dev Dyn, 1994, 201(4): 297.
- [10] Tamagawa M, Morita J, Naruse T. Effects of all-trans-retinoic acid on limb development in the genetic polydactyly mouse[J]. J Toxicol Sci, 1995, 20(4): 383.

(编辑 张敏瑞)

细胞凋亡与腭裂发生关系的动物实验 (正文见第 246 页)

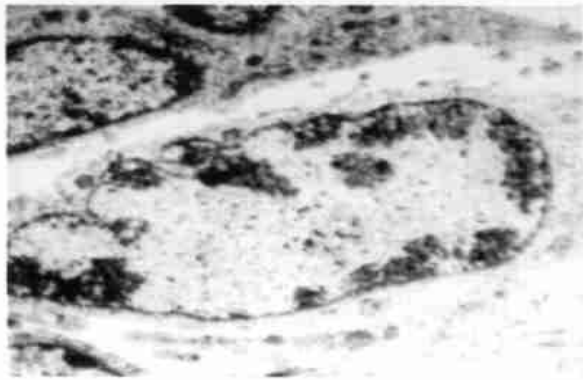
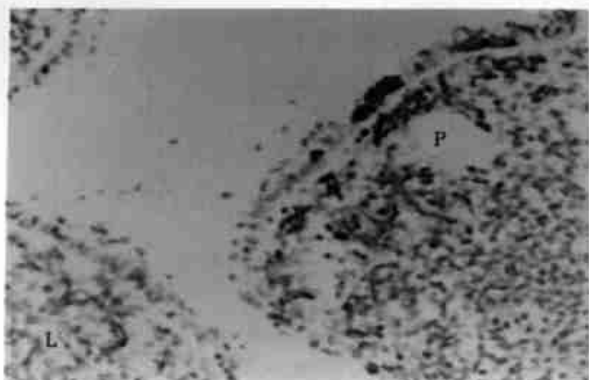


图 1 凋亡细胞 ISEL 法染色组织切片

Fig. 1 Apoptotic cells were stained deep brown  
L - lingua; P - palate shelf (ISFL, × 100)

图 2 凋亡细胞透射电镜观察

Fig. 2 An apoptotic dying cell (× 12 000)

颊侧短固位臂—远中邻面板硬固位体固位力测试 (正文见第 261 页)

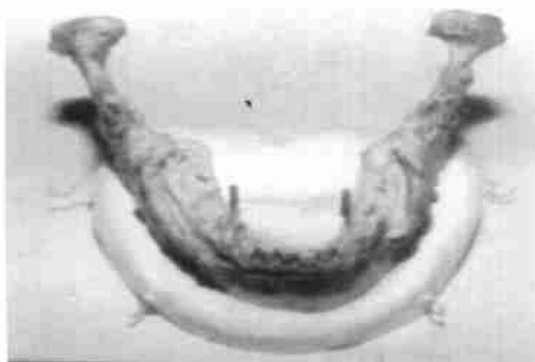


图 1 离体下颌骨模型(石膏底座及就位道标志杆)  
Fig.1 Human mandible (Gypsum supporter and indicating rod of insertion path)



图 2 颊侧短固位臂—远中邻面板硬固位体  
Fig.2 Short buccal retentive arm - distal guiding plate hard retainer

三种烤瓷贴面牙体预备的临床效果修复评价 (正文见第 294 页)

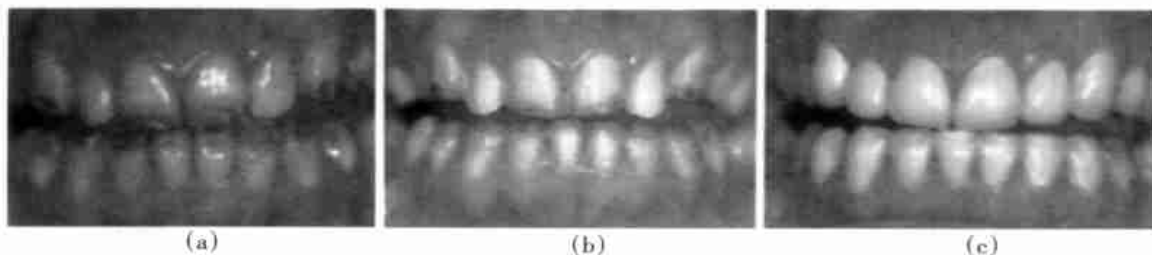


图 2 牙釉质发育不全病例 PLV 修复前后

Fig. 2 Before and after PLV restoration of dental enamel hypoplasia

(a) Before restoration; (b) After preparation (2|2 are type I, others are type L); (c) After PLV bonded