

# Electron Microscopic Study of the Embryonic Palate during Cleft Palate Formation

## 先天性腭裂形成中胚胎腭器官的电镜观察

DONG Hong-mei<sup>1</sup>, DENG Mo-hong<sup>2</sup>, WANG Dian<sup>1</sup>, SONG Hui<sup>3</sup>  
(1. Department of Forensic Medicine, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong; 2. Department of Oral-maxillary Surgery, Wuhan University Stomatology Medical College, Wuhan 430079, Hubei; 3. Department of Pharmacology, Shantou University Medical College, Shantou 515041; Guangdong, China)

董红梅<sup>1</sup>/邓末宏<sup>2</sup>/王典<sup>1</sup>/宋卉<sup>3</sup>  
(1. 汕头大学医学院法医教研室, 广东 汕头 515041; 2. 武汉大学口腔医学院口腔颌面外科, 湖北 武汉 430079; 3. 汕头大学医学院药理教研室, 广东 汕头 515041)

**【摘要】**背景与目的: 建立先天性腭裂模型观察其形成过程中胚胎腭突细胞的超微结构改变。材料与方法: 于 NIH 雌性小鼠受孕第 12.5 d(GD12.5)通过腹腔注射磷酸地塞米松(50 mg/kg)诱发 NIH 小鼠胚胎先天性腭裂模型,同时设正常对照组注射生理盐水相同条件下饲养。实验组和对照组母鼠分别于 GD13.5、GD14.5、GD15.5 脱颈处死,剖腹取出胎鼠,切取胎鼠头部制作光镜和电镜样本,采用扫描电镜和透射电镜观察胚胎腭发育及先天性腭裂形成过程中腭突细胞的超微结构。结果: 随着胚胎发育,对照组腭突双侧裂隙逐渐变小,上皮基底膜破坏,腭突中嵴上皮细胞(MEE)细胞核染色质呈块状并边集,并可见上皮细胞内出现分泌物质,腭间充质细胞(EPM)细胞之间基质丰富,胚胎 GD15.5 腭突完全融合;实验组腭突生长缓慢,体积较同期对照组小,随着腭突的发育,腭突表层 MEE 细胞仍然连接紧密,基底膜完整,上皮细胞多层化,细胞表面出现纤毛,EPM 细胞之间基质较少,在 GD15.5 形成裂隙。结论: 地塞米松作用后胚胎腭突细胞的正常发育分化受到影响,从而导致腭裂形成。

**【关键词】**先天性腭裂; 胚胎; 电镜观察

中图分类号: R730.45

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2008)03-0175-03

**【ABSTRACT】** BACKGROUND AND AIM: To observe the ultrastructure of embryonic palate cells during cleft palate formation using the model of congenital cleft palate. MATERIALS AND METHODS: The model of congenital cleft palate was induced in NIH mice by intraperitoneal injection of dexamethasone on GD12.5. The control group was raised under the same condition except the injection of dexamethasone. The mice was sacrificed by cervical dislocation on GD13.5, GD14.5 and GD15.5. The fetal mice were removed and the heads were cut for light and electron microscopic studies. The embryonic palate and the palatal cells were examined by SEM and TEM during the process of the palate development and congenital cleft palate formation. RESULTS: In the control group, with the embryonic development, the cleft was diminished, basal epithelial membrane was broken down, pieces of nuclear chromatin became margined, excretion appeared in the MEE cell, the matrix was abundant between EPM cells, palatine shelves were fused completely on GD15.5. In the experimental group, palatine shelf grew slowly, and was smaller than the control group at the same time point, MEE cells on the palatine shelf surface were connected tightly yet with the development of palatine shelves, basal membrane remained intact, epithelial cell became multiplayer, cilia appeared on the cell surface, the matrix was less between EPM cells, the cleft was formed on GD15.5. CONCLUSION: The development and differentiation of embryonic palatal cells were affected after being exposed to dexamethasone, which was associated with cleft palate formation.

**【KEY WORDS】** congenital cleft palate; embryo; electron microscope

收稿日期: 2007-06-09; 修订日期: 2008-01-16

作者简介: 董红梅(1972- )女,汉族,山西宁武人,博士,讲师,研究方向:

分子病理学, Tel: 0754-8900433; E-mail: hmdong@stu.edu.cn,

hongmeidong1@126.com

本研究采用地塞米松诱导小鼠先天性腭裂发生,通过观察先天性腭裂发生过程中胚胎腭细胞的超微结构变化,以探讨腭突中嵴上皮细胞 (medial edge epithelial, MEE) 和胚腭间充质细胞 (embryonic palatal mesenchyme, EPM) 发育分化的异常改变与先天性腭裂发生之间的关系。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物及分组** 6~8 周龄 NIH 小鼠 60 只,雌性,体重 25~30 g,由武汉生物制品研究所提供,将小鼠随机分为正常组及实验组,每组各 30 只,相同条件饲养。按 1:2 比例与雄鼠同笼过夜,次晨检查,如发现阴栓则认为雌鼠已受孕,记为 GD(gestation day)0.5。实验组孕鼠在 GD12.5 腹腔注射磷酸地塞米松 (50 mg/kg),对照组以等量生理盐水代替。分别于 GD13.5、GD14.5、GD15.5 颈椎脱臼处死母鼠,每组各 5 只,剖腹取出胎鼠,切取胎鼠头部。

**1.2 标本的制备** 将新鲜胎鼠头部标本在 4% 中性甲醛中固定后,石蜡包埋,以麦克尔氏软骨为基准面,作冠状位连续切片 (7  $\mu$ m),常规 HE 染色,光镜观察。

**1.3 扫描电镜观察** 随机选取各组不同胎龄的胎鼠头部标本各 2 只,在解剖显微镜下仔细去除胎鼠的下颌及舌器官,保持腭器官不被破坏。2.5% 戊二醇固定 24 h,梯度酒精脱水,粘台 (注意腭口腔面朝上),真空干燥,喷金镀膜,日立 S-300 扫描电镜观察。

**1.4 透射电镜观察** 标本处理同 1.3,固定、梯度酒精脱水后,制作超薄切片 (60 nm),醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,日立 S-450 透射电镜观察。

## 2 结 果

**2.1 光镜观察结果** 对照组在 GD13.5 到 GD15.5 随着胎龄延长,腭突从位于舌体两侧呈垂直生长的位置逐渐上抬到舌体上方呈水平相对生长,在 GD15.5 腭突

相互接触后形成完整的腭器官。实验组腭突生长缓慢,体积较同期对照组小,双侧腭突上抬不对称,在 GD15.5 时双侧腭突不能在中线区相互接触,形成裂隙 (图 1)。

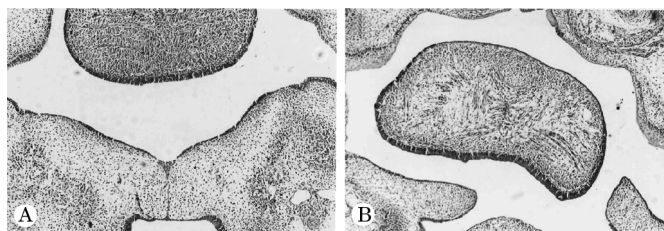


图 1 光镜下小鼠 GD15.5 腭突生长情况的观察 (HE  $\times$  100)。A: 腭突相互接触后形成完整的腭器官; B: 腭突偏离水平位生长,不能在中线区相互接触

Figure 1 The morphology of palatine shelves on GD15.5 (HE  $\times$  100). A: The plate organ was formed completely by fusion of palatine shelves; B: The palatine shelves grew deviated from horizontal position, didn't touch in median line.

**2.2 扫描电镜观察结果** 见图 2。对照组在胚胎 GD13.5 双侧腭突裂隙较宽,表层 MEE 细胞呈多边形,细胞之间连接丰富,随着胚胎发育,腭突上抬,双侧裂隙显著变小,胚胎 GD15.5 腭突完全融合,口腔面上皮细胞排列整齐。实验组在胚胎 GD13.5 与对照组 GD13.5 差别较小,腭突体积较同期对照组略小,随着胚胎的发育,腭突体积差距增大, GD15.5 相对腭突未能融合,表层 MEE 细胞表面出现纤毛。

**2.3 透射电镜观察结果** 见图 3。对照组在 GD13.5 腭突上皮细胞基底膜尚完整; GD14.5 可见上皮基底膜开始破坏,细胞核染色质呈块状并边集,并可见上皮细胞内出现分泌物质,间充质细胞丰富,胞浆内充满分泌物质,细胞之间有大量基质; GD15.5 腭突上皮细胞消失,细胞呈多边形间充质细胞。实验组在 GD13.5 与对照组差别不显著,基底膜完整,上皮细胞 GD14.5 未见上皮基底膜破坏,上皮细胞胞浆丰富,但分泌物质少,间充质细胞之间基质较少; GD15.5 上皮基底膜仍保持完整,上皮细胞呈多层。间充质细胞有少量分泌物质,细胞外基质较对照组少。

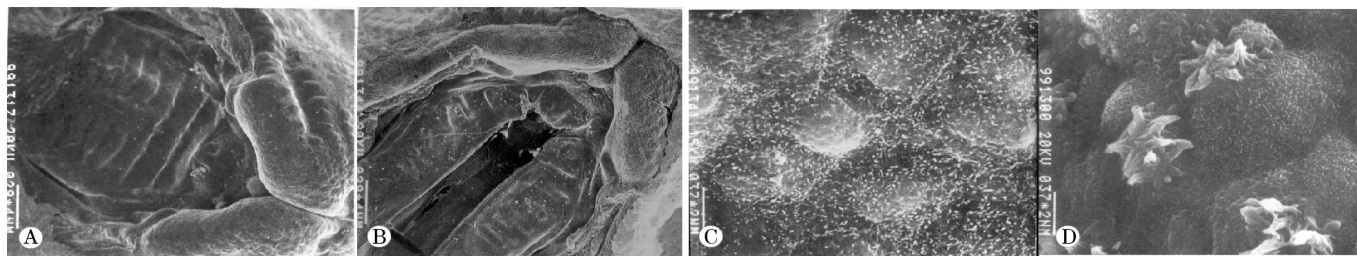


图 2 扫描电镜下小鼠 GD15.5 腭突生长情况的观察。A: 对照组 GD15.5 腭突完全融合,形成完整的腭器官 (SEM  $\times$  50); B: 实验组 GD15.5 腭突未能融合,腭部裂隙形成 (SEM  $\times$  50); C: GD15.5 对照组口腔面双侧腭突连接,表层 MEE 细胞连接紧密 (SEM  $\times$  4000); D: GD15.5 实验组腭突表层 MEE 细胞出现纤毛 (SEM  $\times$  4000)

Figure 2 The SEM observation of palatine shelves on GD15.5 A: The complete plate organ is formed by fusion of palatine shelves in control group. (SEM  $\times$  50); B: The palatine shelves weren't fused, the cleft was formed in experimental group (SEM  $\times$  50); C: The palatine shelves in oral surface were connected in control group, and the medial edge epithelial cells were connected tightly (SEM  $\times$  4000); D: The cilia appeared on the medial edge epithelial cell surface in experimental group (SEM  $\times$  4000).

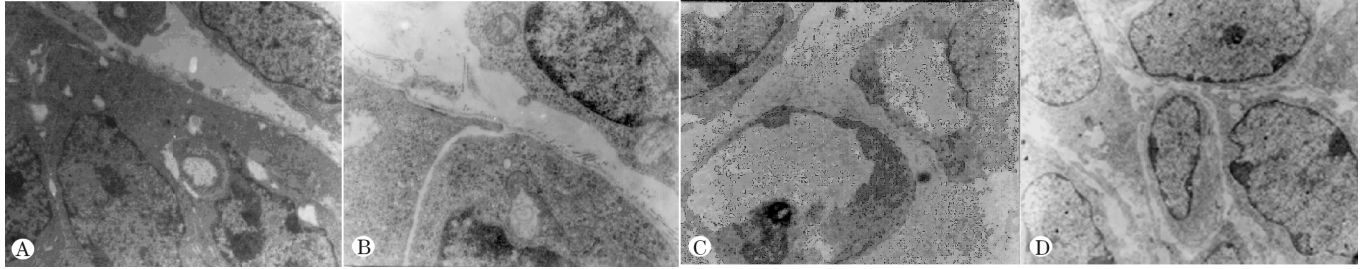


图 3 透射电镜下小鼠腭突生长情况的观察 (TEM×7 000)。 A: 在 GD14.5 对照组腭突上皮基底膜溶解断裂, 上皮细胞内出现分泌样物质, 细胞核染色质块状边集, 间充质细胞间质丰富; B: 在 GD14.5 实验组腭突上皮细胞基底膜完整; C: GD15.5 对照组腭突上皮细胞消失, 间充质丰富; D: 在 GD15.5 实验组腭突上皮细胞仍然多层排列。

Figure 3 The TEM observation of palatine shelves(TEM×7000) A: The basal membrane was brokendown, excretion appeared in the medial edge epithelial cell, nuclear chromatin became piece and edge-collection, the matrix was abundant between embryonic palatal mesenchyme cells on GD14.5 in control group; B: The basal membrane remained complete on GD14.5 in experimental group; C: The epithelial cells of palatine shelf disappeared on GD15.5, the matrix was abundant in control group; D: The endothelial cells were lined by multiplayer on GD15.5 in experimental group.

### 3 讨 论

小鼠胚胎腭的发育过程包括腭发生前期、腭突发生期、垂直生长期、腭突上抬及水平生长期、接触融合期、分化成熟期等阶段, 其中胚胎 7~12 d 为腭器官发生期, 胚胎 12~15 d 为腭发育形成期。胚胎腭的发生发育期是腭器官的形成时期, 也是致畸药物作用的敏感时期<sup>[2]</sup>。研究表明, 多种药物均可在 GD10 到 GD14 诱发胎鼠先天性腭裂的发生, 而在 GD15 胚胎腭发育形成后再给予药物, 则不能诱发先天性腭裂发生<sup>[3-4]</sup>。文献报道及本课题组以前的研究均发现在 GD12 给予糖皮质激素能有效地诱导先天性腭裂的发生。本研究发现, 在 GD12.5 腹腔注射 50 mg/kg 磷酸地塞米松后, 胚胎鼠的腭突上抬延迟, 且水平生长的腭突体积较同期正常组的小, 不能在中线区接触融合, 从而导致先天性腭裂的形成。通过扫描电镜观察也发现实验组的腭突较同期对照组显著减小, 在 GD15.5 时仍有较宽的裂隙存在。

胚胎腭突由 MEE、EPM 和细胞外基质组成。中 MEE 是腭突融合前位于腭突中线边缘的外胚层细胞, 在胚胎腭器官形成的过程中, 其转归途径包括 ①退化或死亡, ②上皮-间充质转化。当胚胎受到致畸因素的影响时, 细胞转归发生异常改变: 其分化为口腔样上皮, 即复层扁平鳞状上皮, 或分化为鼻腔样上皮, 即假复层纤毛柱状上皮, 以及有少部分变为间充质细胞<sup>[1]</sup>。在本研究中我们发现, 随着胚胎发育, 正常腭突的表层 MEE 细胞由连接紧密、排列整齐改变为连接松散乃至细胞脱落, 同时基底膜破坏, 最终 MEE 细胞消失, 两侧腭突相互连接融合。而在实验组中 MEE 细胞的转变与对照组明显不同, 在 GD15.5 上皮基底膜仍保持完整, MEE 表现为多层上皮细胞, 表层细胞表面出现纤毛。

EPM 细胞是腭突的主要细胞成分, 其发育与分化持续于整个胚胎腭的发育形成过程, 参与腭部的骨组织、肌肉及血管等形成。EPM 细胞具有合成胶原蛋白、

氨基多糖等细胞外基质的能力, 这些分子的合成及分泌可引起腭突体积增大、上抬。当受致畸因素作用后, EPM 细胞的发育、分化及合成细胞外基质的能力均受到抑制, 从而导致腭突体积变小, 上抬延迟。本研究中, 我们发现对照组间充质细胞丰富, 分泌现象明显, 细胞之间有大量基质, 而在实验组间充质细胞出现分泌现象时期晚, 在 GD15.5 才出现明显的分泌, 同时细胞外基质也较同期对照组明显少。这说明地塞米松对 EPM 细胞的合成、分泌细胞外基质的能力产生了抑制作用, 这可能是实验组腭突体积变小, 上抬延迟的原因。

本研究显示, 在 GD12 使用地塞米松后, 胚胎腭突融合部位上皮细胞、间充质细胞的发育、分化与对照组明显不同, 这些改变与先天性腭裂的形成有关, 但导致这些细胞改变的确切机制尚待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 傅豫川. 腭裂发生机制的生物学基础 [M]// 樊明文. 口腔医学新进展. 武汉: 武汉科学技术出版社, 2000: 129-144.
- [2] Ferguson MJ. Palate development[J]. Development, 1990, 103 (suppl): 41-60
- [3] Reddy CS, Hanumaiah B, Hayes TG, et al. Developmental stage specificity and dose response of secalonid acid D-induced cleft palate and the absence of cytotoxicity in developing mouse palate[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1986, 84 (2): 346-354.
- [4] Abbott BD, Harris MW, Birnbaum LS. Comparisons of the effects of TCDD and hydrocortisone on growth factor expression provide in sight into their interaction in the embryonic palate [J]. Teratology, 1992, 45(1): 35-47.
- [5] 邓末宏, 龙星, 李宏礼. 地塞米松诱发先天性腭裂对 TGF-β1、TGF-β2 表达的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2003, 19(6): 598-600.
- [6] 黄磊, 石冰, 孙晋虎, 等. 地塞米松对体外培养 A 系小鼠腭突腭中嵴上皮融合的影响 [J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(2): 103-105.

