

# 转化生长因子B3基因与腭融合

李丽 郑谦

口腔疾病研究国家重点实验室 华西口腔医院唇腭裂外科(四川大学) 成都 610041

**[摘要]** 在腭发生过程中, 腭突上皮(MEE)形成腭中缝(MES), 而后MES裂解消失完成腭部融合, 其中转化生长因子(TGF)B3在MES裂解过程中是不可缺少的。TGFB3调控MEE细胞发生上皮-间质转化(EMT)是目前MES裂解机制研究的热点。TGFB3蛋白通过激活磷酸化的Smad2与Smad4复合体和磷脂酰肌醇-3-激酶(PI<sub>3</sub>K)信号转导通路, 需要淋巴细胞样增强因子1和扭曲蛋白等多种信号转录因子及其他信号的协调配合调控腭部EMT过程。本文重点对TGFB3基因在MES裂解过程中的作用、其介导的信号通路及相关研究进展等作一综述。

**[关键词]** 转化生长因子; 腭中缝; 上皮-间质转化; 信号转导通路

**[中图分类号]** Q 786 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2014.04.017

**Transforming growth factor B3 in the development of palate** Li Li, Zheng Qian. (State Key Laboratory of Oral Diseases, Dept. of Cleft Lip and Palate Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** During palatal fusion, the epithelium that covers the tip of opposing palatal shelves adheres, intercalates and thins into a single-layer medial edge seam(MES). The disintegration of the MES results in the confluence of the palatal mesenchyme. Transforming growth factor(TGF)B3 is essential for palate development, especially in the late phase of palatogenesis, in which the palatal MES disintegrates and mesenchymal confluence occurs. Regulation of medial-edge epithelium(MEE) cell completion of the epithelial—mesenchymal transition(EMT) by TGFB3 has become the primary concern of the fate of MEE cells. TGFB3 activates the transcription complexes of Smad2, Smad4, phosphatidylinositol-3-kinase, Lef1, Twist, and other transcription factors to regulate the palatal EMT program. The function of TGFB3 gene in the MES disintegration process, associated mediated signal transduction pathways, and related research progress are summarized in this paper.

**[Key words]** transforming growth factor; medial edge seam; epithelial—mesenchymal transition; signal transduction pathway

在腭发生的过程中, 当两侧腭突在舌部上方中线接触时, 腭突上皮(medial-edge epithelium, MEE)形成腭中缝(medial edge seam, MES), 而后MES裂解消失完成腭部融合, 若MES裂解失败则导致腭裂<sup>[1-2]</sup>。转化生长因子(transforming growth factor, TGF)B3作为针对人类非综合征性唇腭裂(non-syndromic cleft lip and palate, NSCLP)研究的候选基因之一<sup>[3]</sup>, 主要作用于腭

突融合过程中。尽管有关MES的裂解机制争议较大, 但可以肯定的是, TGFB3基因在腭发生中是不可缺少的。本文着重就TGFB3基因在MES融合中作用的相关研究进展作一综述, 以期操纵和干预TGFB3基因在腭发生中可能产生的重大的治疗潜力。

## 1 TGFB3基因在腭发生中的作用

TGFB蛋白具有广泛的生物学活性, 可调节多种生理功能, 在细胞增殖、分化、迁移、黏附和死亡以及胚胎发生和组织分化等方面发挥着重要的作用。哺乳动物的TGFB蛋白有TGFB1、

**[收稿日期]** 2013-05-15; **[修回日期]** 2014-01-15

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81070498)

**[作者简介]** 李丽, 硕士, Email: li\_li19860601@163.com

**[通讯作者]** 郑谦, 教授, 博士, Email: zq652@163.com

TGFB2和TGFB3三种亚单位,含有71%~76%的相同序列。*TGFB3*基因位于人类14q24,大小为43 kb,含6个内含子和7个外显子,具有广泛的生物学功能,在诱导腭发生方面具有重要的作用。

### 1.1 *TGF3*基因对于腭融合不可或缺

TGFB3蛋白在腭发生过程中,尤其在MES裂解阶段通过信号转导通路介导MES完成腭间质的融合。通过靶基因敲除等技术作用于小鼠,其*TgfB*基因各亚型具有明显的表型差异且无重叠,*TgfB1*基因缺失的胎鼠在未出生前即死亡,*TgfB2*基因缺失的小鼠多为颌骨畸形,而*TgfB3*基因缺失的小鼠出现明显的腭裂。*TgfB3*<sup>-/-</sup>基因缺失小鼠出现的唯一颅面缺陷是继发性腭裂<sup>[4]</sup>。在体外培养家禽类(譬如鸡)未融合的腭突并加入外源性的*TgfB3*基因,其腭部融合,如果给予反义脱氧核糖核酸阻断*TgfB3*基因,则可阻止其腭部融合过程<sup>[5]</sup>。这就表明,*TGFB3*基因在腭融合中起着不可或缺的作用。

### 1.2 *TGFB3*基因在MES裂解中的作用

在胎鼠11.0~16.5 d,*TGFB3*蛋白在其腭发生不同阶段表达不同。在11.0~11.5 d,腭突从上颌突出,在腭突上皮中可以检测到*TGFB3*蛋白;腭突继续垂直生长,在13.0~13.5 d,腭突抬高,*TGFB3*蛋白在腭突上皮中高度表达;在14.0~14.5 d,MEE细胞逐步黏附形成MES,*TGFB3*蛋白表达强烈;在15.0 d,MES开始裂解,MEE细胞逐渐减少,*TGFB3*蛋白仅表达于剩余的上皮缝;在15.5 d时,*TGFB3*蛋白表达于上皮岛。当腭发生进入晚期阶段,即胎鼠16.0 d时,*TGFB3*蛋白的表达量受到限制;在胎鼠16.5 d,上皮—间质转化(epithelial—mesenchymal transformation, EMT)完成,MES完全裂解,*TGFB3*蛋白消失。由此可见在腭发生过程中,在MEE的EMT最活跃的时期,*TGFB3*蛋白表达最为强烈<sup>[6]</sup>。

## 2 *TGFB3*蛋白介导EMT过程

EMT是MES裂解的关键。在细胞和细胞之间,上皮钙黏着蛋白(epithelium-cadherin, E-cad)丢失是EMT的特征<sup>[7]</sup>。*TGFB3*蛋白通过其信号转导通路调控腭突EMT,降低E-cad的表达,MES裂解形成小的上皮岛,最终完成间质的融合。*TGFB3*蛋白通过Smad依赖性通路和Smad非依赖性通路激活淋巴细胞样增强因子(lymphoido-

cyte enhancer factor, LEF)1和蜗牛蛋白(snail)等介导EMT的发生。

### 2.1 Smad依赖性信号转导通路

*TGFB*信号主要是通过Smad家族介导,该家族蛋白将*TGFB*超家族信号由1型受体转导至细胞核内,共同激活或者抑制其调节的靶基因转录。*TGFB3*信号通过磷酸化的Smad2或Smad3与Smad4形成复合体转移至细胞核,激活*LEF1*基因,*LEF1*基因与*E-cad*基因启动子结合激活EMT。

在MEE细胞发生EMT期间,用反义寡聚脱氧核糖核酸抑制细胞核外的 $\beta$ -连环蛋白不会阻止EMT,即在腭发生中,*TGFB3*蛋白不依赖于 $\beta$ -连环蛋白,而是通过Smad介导细胞信号通路的传导。只有受到*TGFB3*蛋白活化的LEF1蛋白,才能促使MEE完成EMT。Smad4和LEF1上调间质标志蛋白质,不受 $\beta$ -连环蛋白的支配。在*TGFB3*蛋白不存在时,Smad2依旧在细胞质中不能被磷酸化,细胞依然维持上皮形态,没有其他信号分子可以补偿缺失的*TGFB3*蛋白。在腭发生中,*TGFB3*蛋白通过磷酸化的Smad2-Smad4复合体介导*LEF1*基因的转录。如果阻断Smad4则EMT过程受到抑制,只有被Smad激活LEF1蛋白,上调EMT的靶基因,使LEF1蛋白转录因子的活性及LEF1蛋白表达增加,促使腭完成EMT<sup>[8-9]</sup>。*TGFB3*蛋白通过Smad2-Smad4-LEF1信号转导通路抑制MEE中E-cad的表达<sup>[7]</sup>。E-cad的减少引起MES裂解形成上皮岛,最终以调控腭突上皮的EMT过程控制腭突的融合。

目前,*TGFB3*蛋白通过*TGFB3*-Smad信号转导通路尚不能说明腭裂发生的所有机制,还需要进一步研究Smad-LEF1蛋白复合体激活的相关基因。*TGFB3*蛋白通过非Smad依赖性信号转导通路调控介导EMT的发生。

### 2.2 Smad非依赖性信号转导通路

*TGFB3*蛋白通过磷酸化的Smad2-Smad4复合体信号调节部分信号转导通路促使腭发生EMT,同样,磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI<sub>3</sub>K)和P38促丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等也可能影响此过程,*TGFB3*蛋白和PI<sub>3</sub>K可能通过蜗牛蛋白、蛞蝓蛋白(slug)、E12/E47、Smad相互作用蛋白(smad-interacting protein, SIP)1、锌指E-盒子结合同源框(zinc finger E-box-binding homeobox, ZEB)1蛋白和扭曲蛋白(twist)等转

录因子直接与E-cad结合,抑制E-cad的转录<sup>[7,10]</sup>。

TGFB3蛋白在腭融合过程中激活PI<sub>3</sub>K, PI<sub>3</sub>K通过P85调节亚族和大鼠肉瘤病毒(rat sarcoma, Ras)蛋白-大鼠肉瘤病毒同源蛋白(Ras homology, Rho)激活MAPK通路,通过LY-294002抑制PI<sub>3</sub>K的活性降低腭融合率<sup>[11]</sup>。TGFB3蛋白介导PI<sub>3</sub>K信号转导,激活某些转录因子诱导靶基因的表达。在腭融合过程中, P38MAPK过量表达,但是TGFB3蛋白激活的P38MAPK的机制目前还不十分明确<sup>[12]</sup>。扭曲蛋白是胚胎形成和EMT的主要调节者,集中表达于腭融合之前的MEE细胞中,在腭融合完成后表达量迅速下降,用小分子干扰RNA扭曲蛋白的表达,则腭融合延迟。Yu等<sup>[13]</sup>推测, TGFB3蛋白可能经PI<sub>3</sub>K通路激活扭曲蛋白,而扭曲蛋白调节腭融合过程。

有研究者<sup>[6]</sup>发现, TGFB3蛋白激活蜗牛蛋白和SIP1转录复合体(不是通过PI<sub>3</sub>K通路)与Smad4形成复合体,捆绑E-cad启动子的E-box单元抑制其的转录。TGFB3蛋白通路激活蜗牛蛋白和SIP1转录因子抑制E-cad,从而诱导MES发生EMT。Brown等<sup>[14]</sup>发现,金属基质蛋白酶25是TGFB3基因的下游靶点,因此,操纵和干预TGFB3蛋白激活的信号转导通路,在腭发生中可能会产生重大的治疗潜力。

### 3 TGFB3蛋白与MES裂解机制

在腭发生过程中, MES裂解是腭融合的关键,而TGFB3蛋白在MES裂解过程中不可或缺。目前MES裂解机制的研究又有新的发现, Ahmed等<sup>[15]</sup>发现, TGFB3蛋白诱导MEE细胞周期阻滞,而后MEE细胞迁移,腭形成晚期细胞程序性死亡完成间质的融合。他们认为, TGFB3蛋白诱导MES裂解是一种按顺序发生连续而又各自独立的过程。Iordanskaia等<sup>[16]</sup>发现, G<sub>1</sub>或S期的细胞EMT, G<sub>2</sub>或M期细胞则程序性死亡; TGFB1蛋白激活p15<sup>ink4b</sup>基因引起细胞周期阻滞, TGFB3蛋白引起EMT和细胞程序性死亡致细胞形态改变,其他信号分子亦参与其调控。

### 4 TGFB3基因多态性与腭裂发生的相关性

焦晓辉等<sup>[17]</sup>在以聚合酶链反应-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测124名NSCLP患者的过程中发现,中国

人的NSCLP与TGFB3基因多态性密切相关。朱江辉等<sup>[18]</sup>对170个NSCLP核心家庭成员的DNA标本进行了TGFB3基因胞嘧啶腺嘌呤(cytosine adenine, CA)重复序列多态性的检测,即在利用传递不平衡检验和单体型相对危险度检验时发现, TGFB3基因的CA重复序列多态性与NSCLP无关;但是,他们在运用家系为基础的相关性检验分析时发现, TGFB3基因的CA重复序列多态性可能是中国部分地区人群发生NSCLP的危险因素。Suazo等<sup>[19]</sup>在对智利NSCLP患者及其父母的研究中发现, TGFB3基因的多态性与NSCLP有关。Kim等<sup>[20]</sup>发现,韩国人群的NSCLP与TGFB3基因的SfaN1多态性有关联,但是刘宁等<sup>[21]</sup>对中国48例NSCLP患者进行的TGFB3基因SfaN1多态性检测未发现其与NSCLP的发生有关。对于同一位点出现截然不同的结果,反映了NSCLP病因的复杂性,也可能缘于样本量、设计方法不同出现的差异。

### 5 小结

不论是细胞迁移和程序性死亡,还是EMT, TGFB3蛋白在腭发生中都是不可缺少的。TGFB3蛋白通过磷酸化的Smad2-Smad4复合体和PI<sub>3</sub>K信号转导通路,同时需要LEF1、扭曲蛋白和蜗牛蛋白等多种信号转录因子及其他信号的协调配合调控腭部EMT过程。尽管业界就TGFB3蛋白通过信号转导通路调控腭突发生EMT完成腭融合已有不少的研究,但是在很大程度上依然不清楚MES区域的上皮是如何具体应对TGFB3蛋白的作用并发生细胞变化的;同时,在临床研究中, TGFB3基因的多态性与腭裂相关性的研究结果不尽相同,可能与地域、种族以及样本量和研究方法不同有关;因此, TGFB3基因与腭发生的作用机制值得进一步研究。

### 6 参考文献

- [1] Nawshad A. Palatal seam disintegration: to die or not to die that is no longer the question[J]. Dev Dyn, 2008, 237(10):2643-2656.
- [2] Yu W, Ruest LB, Svoboda KK. Regulation of epithelial-mesenchymal transition in palatal fusion [J]. Exp Biol Med(Maywood), 2009, 234(5):483-491.

- [3] Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(3):270-278.
- [4] Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, et al. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction[J]. *Nat Genet*, 1995, 11(4):415-421.
- [5] Sun D, Vanderburg CR, Odierna GS, et al. TGFbeta3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme *in vitro*[J]. *Development*, 1998, 125(1):95-105.
- [6] Jalali A, Zhu X, Liu C, et al. Induction of palate epithelial mesenchymal transition by transforming growth factor  $\beta$  3 signaling[J]. *Dev Growth Differ*, 2012, 54(6):633-648.
- [7] Nawshad A, Medici D, Liu CC, et al. TGF beta3 inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 9):1646-1653.
- [8] 陈亦阳, 黄洪章. 转化生长因子 $\beta$ -Smad信号通路在腭发育中的作用[J]. *国际口腔医学杂志*, 2008, 35(6):650-653.
- [9] Cui XM, Shiomi N, Chen J, et al. Overexpression of Smad2 in Tgf-beta3-null mutant mice rescues cleft palate[J]. *Dev Biol*, 2005, 278(1):193-202.
- [10] Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis[J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(5/6):365-375.
- [11] Kang P, Svoboda KK. PI-3 kinase activity is required for epithelial-mesenchymal transformation during palate fusion[J]. *Dev Dyn*, 2002, 225(3):316-321.
- [12] Xu X, Han J, Ito Y, et al. Ectodermal Smad4 and p38 MAPK are functionally redundant in mediating TGF-beta/BMP signaling during tooth and palate development[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2):322-329.
- [13] Yu W, Kamara H, Svoboda KK. The role of twist during palate development[J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(10):2716-2725.
- [14] Brown GD, Nazarali AJ. Matrix metalloproteinase-25 has a functional role in mouse secondary palate development and is a downstream target of TGF- $\beta$ 3 [J]. *BMC Dev Biol*, 2010, 10:93.
- [15] Ahmed S, Liu CC, Nawshad A. Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor(TGF) beta3[J]. *Dev Biol*, 2007, 309(2):193-207.
- [16] Iordanskaia T, Nawshad A. Mechanisms of transforming growth factor  $\beta$  induced cell cycle arrest in palate development[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(5):1415-1424.
- [17] 焦晓辉, 王丽, 徐旭光. 中国人群非综合征性唇腭裂与TGF $\beta$ 3多态性的关系[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2003, 37(5):415-418.
- [18] 朱江辉, 任爱国, 郝玲, 等. 转化生长因子 $\beta$ 3基因多态性与唇腭裂关联的核心家庭分析[J]. *中国生育健康杂志*, 2009, 20(6):346-351.
- [19] Suazo J, Santos JL, Scapoli L, et al. Association between TGFB3 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chilean population[J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2010, 47(5):513-517.
- [20] Kim MH, Kim HJ, Choi JY, et al. Transforming growth factor-beta3 gene SfaN1 polymorphism in Korean nonsyndromic cleft lip and palate patients[J]. *J Biochem Mol Biol*, 2003, 36(6):533-537.
- [21] 刘宁, 刘嘉茵, 崔毓桂, 等. TGF $\beta$ 3基因SfaN1多态性与非综合征性唇腭裂的遗传易感性[J]. *中国美容整形外科杂志*, 2008, 19(2):152-155.

( 本文采编 王晴 )