

维生素 A 族与唇腭裂发生关系的研究进展

李精韬综述 石冰审校

(四川大学华西口腔医院唇腭裂外科 成都 610041)

[摘要] 维生素 A 族与唇腭裂发病的关系一直受到唇腭裂病因研究学者的高度关注,近年来更是对过量维生素 A 族致唇腭裂发病的机制进行了深入的研究。本文就与唇腭裂发病相关的维生素 A 族种类,维生素 A 族在唇腭裂发病中作用的流行病学研究,以及过量维生素 A 族,特别是视黄酸致唇腭裂发生的机制作一综述。

[关键词] 维生素 A 族; 唇裂; 腭裂; 病因学

[中图分类号] R 782.2 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.03.018

Research progress on relationship between Vitamin A and oral clefts Li Jingtao, Shi Bing. (Dept. of Cleft Lip and Palate Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] The relationship between Vitamin A and oral clefts has been constantly highlighted in the researches on clefts etiology, especially the teratogenic effect of hypervitaminosis A. In this article, the classification of Vitamin A, epidemiology and mechanism of hypervitaminosis A induced clefts was reviewed.

[Key words] Vitamin A; cleft lip; cleft palate; etiology

维生素 A 族是保证胚胎正常发育不可或缺的微量元素之一。维生素 A 族缺乏或过量均可导致唇腭裂发病率增高^[1-2]。本文就维生素 A 族与先天性唇腭裂发病关系的研究进展作一综述。

1 与唇腭裂发病相关的维生素 A 族及其衍生物

维生素 A 族是一类脂溶性维生素,包括维生素 A 及类维生素 A。最早引起学者们对维生素 A 族致畸作用关注的维生素 A 族是 13-顺式视黄酸(13-cis-retinoic acids, 13-cis-RA), 又称异维 A 酸(isotretinoin, ITR)。动物实验表明, 13-cis-RA 有导致发育畸形, 流产和死胎的作用。胎儿早期 13-cis-RA 暴露可导致中枢神经, 心血管系统及颅面发育异常^[3]。13-cis-RA 在人体内半衰期为 1 d, 而其具有类似致畸作用的主要代谢产物 4-羟基异维 A 酸有长达 7 d 的半衰期。目前, 在对唇腭裂病因研究中使用最广泛的维生素 A 族致畸剂是维生素 A 的氧化代谢物全反式视黄酸(all-trans-retinoic acid, at-RA)。at-RA 的唇腭裂致畸能力比 13-cis-RA 强 4~8 倍。维生素 A, 即视黄醇, 本身也具有导致腭裂的潜能, 但弱于视黄

酸。另外, 多种维生素 A 族的衍生物在试验中表现出腭裂致畸性, 包括棕榈酸视黄酯、醋酸视黄酯和依曲替酯等, 但均弱于视黄醇。同时维生素 A 缺乏症本身也被视为唇腭裂发病的环境因素^[4]。

2 孕妇维生素 A 族水平与新生儿唇腭裂发生的流行病学研究

维生素 A 族对维持上皮完整至关重要, 常应用于治疗皮肤黏膜疾病。13-cis-RA 作为第 1 代维 A 酸类药物曾被广泛应用于重症囊性痤疮的治疗。at-RA 被用于治疗口腔黏膜疾病, 如扁平苔藓。依曲替酯也常用来治疗严重银屑病。自 13-cis-RA 于 20 世纪 80 年代上市以来, 陆续有临床报道提及怀孕早期较大剂量地口服维 A 酸会导致新生儿唇腭裂的发生。孕妇在孕期前 3 个月接受 40~80 mg·d⁻¹ 剂量的爱忧痛会导致新生儿颌面部包括腭裂在内的严重畸形^[5]。Lammer 等^[6]通过调查 154 名孕期曾使用 ITR 的孕妇得出孕期接触 13-cis-RA 会显著增加后代罹患包括腭裂在内的颌面畸形的风险。另一方面, 不断有临床病例报道提示孕妇维生素 A 缺乏症是导致新生儿患唇腭裂的危险因素。流行病学调查表明, 唇腭裂患儿母亲的血浆维 A 酸水平低于正常儿童的母亲, 且被动吸烟的唇腭裂患儿母亲的血浆维 A 酸水平更低^[7-8]。Johansen 等^[1]研究了 535 名唇腭裂患儿母亲和 693 名

[收稿日期] 2011-11-24; [修回日期] 2012-02-13

[作者简介] 李精韬(1986—), 男, 湖北人, 硕士

[通讯作者] 石冰, Tel: 13666170278

正常儿童母亲孕期维生素 A 族摄入量水平。结果显示, 维生素 A 族摄入量最高的 5% 孕妇其后代患腭裂的风险较低。病例对照研究表明, 正常水平的维生素是腭正常发育的必要条件, 能有效降低唇腭裂的发生。这也提示, 维生素 A 族在唇腭裂发病中扮演着双刃剑的角色。一方面, 过量的外源性暴露或维生素 A 族缺乏症会导致唇腭裂发病升高; 另一方面, 适量的补充维生素 A 族可预防唇腭裂发病^[9]。

3 维生素 A 族致腭裂动物模型

鉴于在动物实验中维生素 A 族与腭裂发生的密切关系, 1965 年就有学者以口饲的方法建立腭裂小鼠模型。动物实验中腭裂发生率与维生素 A 族干预呈剂量依赖关系^[10]。Reynolds 等^[11]通过对怀孕第 10 天的 Swiss Webster 小鼠口饲 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ at-RA 诱导出 100% 腭裂小鼠模型。Inomata 等^[12]对怀孕第 11 天 muta 小鼠口饲 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 维生素 A 亦得到 100% 腭裂小鼠模型。此外, Kochhar 等^[10]报道, 以二巯英或乙醇这 2 种唇腭裂致畸剂与视黄酸协同可在远小于单一试剂致畸浓度下建立 100% 腭裂小鼠模型。

4 维生素 A 族致唇腭裂发生的机制研究进展

目前对过量维生素 A 族致唇腭裂发病的研究大多集中在 at-RA 上。腭发生是一个有明显时间和空间特点的复杂过程, at-RA 对其影响也具备时间性与空间性。在小鼠孕期第 10 天介入 at-RA 干预会导致腭胚突间充质 (mouse embryonic palatal mesenchymal, MEPM) 细胞程序化死亡增多, 细胞增殖周期被阻断, 大量细胞停滞在 G_0/G_1 期而无法进入 S 期, 从而形成小腭突, 双侧腭突无法接触, 腭突上皮化生成复层扁平上皮细胞。若改为在孕期第 12 天介入, MEPM 细胞增殖周期不受明显影响, 双侧腭突可发育至正常大小甚至接触。但腭上抬延迟, 双侧腭突无法融合。MEPM 细胞排列紊乱, 细胞水合水平降低, 细胞间质中胞外多糖和透明质酸沉积减少。接触处腭中嵴上皮 (medial edge epithelium, MEE) 不消失反而增殖并化生为假复层纤毛柱状上皮细胞^[13]。目前认为, 与维生素 A 族致唇腭裂分子机制关系最密切的是转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 相关信号通路。Nugent 等^[14]在小鼠孕期第 12 天口饲 at-RA, 24 h 后检测胎鼠 MEPM 细胞 TGF- β 水

平发现 TGF- β_1 蛋白水平降低, TGF- β_2 、TGF- β_3 蛋白水平无明显变化, 但 3 种 TGF- β mRNA 水平均明显上升, 且活化的 TGF- β 分子占总 TGF- β 分子的比例上升。在体外培养的 MEPM 细胞培养基中加入 at-RA 和 TGF- β 蛋白会抑制细胞对胸腺嘧啶的摄入从而抑制细胞的 DNA 合成, 且这种作用可以被 TGF- β 抗体减轻。TGF- β mRNA 表达水平的快速反应表明 at-RA 直接作用于 TGF- β 信号通路, TGF- β 是 at-RA 作用于 MEPM 细胞的直接介质。at-RA 有能力精细调控 TGF- β 亚型也提示二者间的作用是一个十分复杂的机制。同时, TGF- β_3 是参与形成软骨的重要分子, Baroni 等^[15]认为 at-RA 可通过调节 TGF- β_3 信号通路抑制腭发育中的软骨形成。at-RA 通过上皮生长因子 (epithelium growth factor, EGF) 作用于腭发育也得到深入的认识。at-RA 于 EGF 主要作用于 MEE 上皮。在正常的腭发育过程中, 当腭突上抬接触后, MEE 细胞 EGF 受体表达降低, DNA 合成减少, 细胞进入程序化死亡。而在小鼠孕期第 12 天口饲 at-RA 后胎鼠 MEE 上皮持续表达 EGF 及 EGF 受体, 导致 MEE 细胞持续增殖。这种作用在体外器官培养的腭胚突中也可观察到。且在 EGF 基因敲除小鼠中, at-RA 诱导腭裂发生的几率明显降低^[16]。Smad 蛋白作为参与唇腭裂发病的重要分子信号也参与到 at-RA 致病机制中。Wang 等^[17]检测分别于孕期第 10 天和第 12 天口饲 at-RA 的小鼠 MEPM 细胞中 Smad 蛋白表达水平, 结果显示在孕期第 10 天接受干预的 MEPM 细胞增殖周期受到阻断, Smad2 和 Smad3 的 mRNA 及蛋白水平显著提高。而在孕期第 12 天接受干预的 MEPM 细胞中 Smad 蛋白水平未受影响。这提示, Smad2 和 Smad3 蛋白参与到 at-RA 在腭发生早期抑制 MEPM 细胞的增殖。亦有研究表明, at-RA 通过调节骨形态发生蛋白 (bone morphology protein, BMP) 干扰腭正常发育。Ho 等^[18]在 at-RA 诱导腭裂的胎鼠 MEPM 细胞中发现 BMP-2、4、7 的蛋白和 mRNA 水平受到下调。Guo 等^[19]的实验表明, at-RA 抑制细胞增殖的能力与其下调 BMP-7 蛋白水平的能力相当。这也提示 at-RA 抑制 MEPM 细胞的机制有 BMP 参与。Msx-1 基因敲除小鼠出现腭裂提示其在腭发育中的重要作用。在 at-RA 干预的 MEPM 细胞中 Msx-1 蛋白及 mRNA 水平降低。在 MEPM 细胞培养基中加入 TGF- β 亦有同样的效果。这就提示存在 at-RA—TGF- β —Msx-1

信号通路参与抑制 MEPM 增殖^[20]。血小板衍生因子(platelet-derived growth factor, PDGF)-C 是促进 MEPM 细胞有丝分裂的重要因子。研究显示, at-RA 和 PDGF-C 抗体均会下调 MEPM 细胞中 PDGF-C 表达水平并抑制细胞增殖^[20]。Kuriyama 等^[21]发现, 经 at-RA 处理孕鼠的胎鼠在腭发育关键的胚胎第 14.5 天 CpG 基因位点甲基化水平显著降低, 并提示 DNA 甲基化水平的降低是 at-RA 致腭裂的重要机制。Ho 等^[18]亦提出 at-RA 在小鼠受孕第 13 到 16 天会促进一氧化碳合成酶在腭胚突特定区域的表达, 通过合成的一氧化碳与组织中超氧化物作用对细胞造成不可修复的损伤, 造成 MEPM 细胞中程序化死亡上升。Okano 等^[13]发现经口饲 at-RA 孕鼠的胎鼠会发生特定基因的突变, 并提出造成腭发育关键基因突变也可能是 at-RA 致腭裂发生的机制之一。

5 参考文献

- [1] Johansen AM, Lie RT, Wilcox AJ, et al. Maternal dietary intake of Vitamin A and risk of orofacial: Population based case-control study in Norway[J]. *Am J Epidemiol*, 2008, 167(10): 1164-1170.
- [2] Song HM, Nacamuli RP, Xia W, et al. High-dose retinoic acid modulates rat calvarial osteoblast biology[J]. *J Cell Physiol*, 2005, 202(1): 255-262.
- [3] Campbell JL Jr, Smith MA, Fisher JW. Dose-response for retinoic acid-induced forelimb malformations and cleft palate: A comparison of computerized image analysis and visual inspection[J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2004, 71(4): 289-295.
- [4] Yu Z, Xing Y. All-trans retinoic acid inhibited chondrogenesis of mouse embryonic palate mesenchymal cells by down-regulation of TGF-beta/Smad signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(3): 929-934.
- [5] Willhite CC, Hill RM, Irving DW. Isotretinoin-induced orofacial malformations in humans and hamsters[J]. *J Craniofac Genet Dev Biol Suppl*, 1986, 2: 193-209.
- [6] Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, et al. Retinoic acid embryopathy[J]. *New Engl J Med*, 1985, 313(14): 837-841.
- [7] Hozyasz KK, Chelchowska M, Surowiec Z. Plasma Vitamin A in mothers of children with orofacial clefts[J]. *Ginek Pol*, 2004, 75(2): 139-144.
- [8] Hozyasz KK, Chelchowska M. Vitamin A levels among nonsmoking mothers of children with orofacial clefts married to a smoke[J]. *Przegl Lek*, 2004, 61(10): 1083-1085.
- [9] Mitchell LE, Murray JC, O'Brien S, et al. Retinoic acid receptor alpha gene variants, multivitamin use, and liver intake as risk factors for oral clefts: A population-based case-control study in Denmark, 1991-1994[J]. *Am J Epidemiol*, 2004, 158(1): 69-76.
- [10] Kochhar DM, Penner JD. Developmental effects of isotretinoin and 4-oxo-isotretinoin: The role of metabolism in teratogenicity[J]. *Teratology*, 1987, 36(1): 67-75.
- [11] Reynolds PR, Schaalje GB, Seegmiller RE. Combination therapy with folic acid and methionine in the prevention of retinoic acid-induced cleft palate in mice[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2003, 67(3): 168-173.
- [12] Inomata T, Kiuchi A, Yoshida T. Hypervitaminosis A resulting in DNA aberration in fetal transgenic mice (Muta Mouse)[J]. *Mutat Res*, 2005, 586(1): 58-67.
- [13] Okano J, Suzuki S, Shiota K. Involvement of apoptotic cell death and cell cycle perturbation in retinoic acid-induced cleft palate in mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 221(1): 42-56.
- [14] Nugent P, Greene RM. MSX-1 gene expression and regulation in embryonic palatal tissue[J]. *Vitro Anim Cell Dev Biol*, 1998, 34(10): 831-835.
- [15] Baroni T, Bellucci C, Lilli C, et al. Retinoic acid, GABAergic, and TGF-beta signaling systems are involved in human cleft palate fibroblast phenotype[J]. *Mol Med*, 2006, 12(9/10): 237-245.
- [16] Abbott BD, Best DS, Narotsky MG. Teratogenic effects of retinoic acid are modulated in mice lacking expression of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2005, 73(4): 204-217.
- [17] Wang M, Huang H, Chen Y. Smad2/3 is involved in growth inhibition of mouse embryonic palate mesenchymal cells induced by all-trans retinoic acid[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2009, 85(9): 780-790.
- [18] Ho CT, Lau TY, Jin Y, et al. Overexpression of iNOS and down-regulation of BMPs-2, 4 and 7 in retinoic acid induced cleft palate formation[J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19(1): 95-104.
- [19] Guo L, Zhao YY, Zhang SL, et al. Retinoic acid down-regulates bone morphogenetic protein 7 expression in rat with cleft palate[J]. *Chin Med Sci J*, 2008, 23(1): 28-31.
- [20] Han J, Xiao Y, Lin J, et al. PDGF-C controls proliferation and is down-regulated by retinoic acid in mouse embryonic palatal mesenchymal cells[J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2006, 77(5): 438-444.
- [21] Kuriyama M, Udagawa A, Yoshimoto S, et al. DNA methylation changes during cleft palate formation induced by retinoic acid in mice[J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2008, 45(5): 545-551.

(本文编辑 骆筱秋)