

• 综述 •

Dkk-Wnt 信号通路在牙齿发育中作用的研究进展

吴也可 综述; 韩向龙, 白丁 审校

(四川大学口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学华西口腔医院正畸科, 四川 成都 610041)

[摘要] 哺乳动物的牙齿发育是外胚层上皮与间充质间相互调控和信号交流的结果, 其中 Dkk-Wnt 信号通路是近年来牙胚发育研究领域的热点。Dkk-Wnt 信号通路已被证实在牙体形成细胞功能的发挥、牙齿模式化、形态发生、牙冠钙化过程中扮演重要作用。牙齿发生发育分子机制的深入研究, 将为牙再生组织工程技术以及相关技术的临床转化提供理论基础。本文就近十年对 Wnt 信号通路在牙齿发育中所起作用的研究作一综述。

[关键词] Wnt; Dkks; 牙齿发育; 牙模式化; 形态发生

[中图分类号] R780.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-2593(2012)05-0298-04

[牙体牙髓牙周病学杂志 2012 22(5): 298]

Research progress on the role of Dkk-Wnt signaling pathway on tooth development

WU Ye-ke, HAN Xiang-long, BAI Ding

(State Key Laboratory of Oral Diseases, Department of Orthodontics,

West China School of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Mammalian tooth development is largely dependent on the sequential and reciprocal epithelial-mesenchymal interaction. Dkk-Wnt signaling pathway has become a hot point in the research field of tooth development. Dkk-Wnt signaling is proved to be critical in the process of tooth-forming cells functioning, tooth patterning, tooth morphogenesis and crown calcification. Elucidation of molecular mechanisms involved in tooth development will surely provide theoretical basis for translational clinical application of tissue engineering strategies such as tooth regeneration. This article is committed to review on the research progress regarding the role of Wnt signaling pathway on tooth development in recent years.

[Key words] Wnt; dkks; tooth development; tooth patterning; morphogenesis

[Chinese Journal of Conservative Dentistry 2012 22(5): 298]

哺乳动物的牙齿发育依赖于外胚层上皮和神经脊来源的外胚间充质细胞间一系列严密调控和信号交互的作用过程, 该过程导致牙源性组织的决定、分化和组织。迄今为止, 已有超过 300 多个基因被证明在发育的牙齿中起作用, 其中 Wingless (Wnt)、Hedgehog (HH)、转化生长因子 β (transfor-

ming growth factor β , TGF- β)、成纤维细胞生长因子 (Fibroblast Growth Factor, FGF) 和骨形态发生蛋白 (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) 五个家族的成员信号分子被证明在组织间调控中起重要作用^[1]。Dickkopf (Dkk) 家族, 由 Dkk-1, 2, 3, 4 以及 Dkk-3 相关基因 soggy 构成, 其中 Dkk1 通过与 LRP5、LRP6 共受体结合, 或者与细胞表面受体 Kremen 1 或 Kremen 2 结合促进 LRP5、LRP6 内化, 最终抑制 Wnt 信号通路^[2]。本文旨在将近年来国内外有关 Wnt 信号通路和 Dkks 分子在哺乳动物牙齿胚胎时期和出生后的发生发育中所起作用以

收稿日期: 2011-11-25

基金项目: 国家自然科学基金资助(31000419, 11172190)

四川省科技厅科技支撑项目(2010SZ0174)

作者简介: 吴也可(1987-), 男, 汉族, 四川人, 博士

通讯作者: 白丁, E-mail: baiding@scu.edu.cn

及相关分子生物学机制的最新研究进展作一综述。

1 Wnt 信号通路的分子学机制

1.1 Wnt 信号通路的结构和功能

Wnt 家族由一组富含半胱氨酸保守序列的分泌型糖蛋白构成,在人和鼠类动物中至少有 19 个成员。这些经脂类修饰的分泌信号蛋白在胚胎发育过程中的形态发生、细胞极性决定和细胞增殖分化、迁移调控等事件中扮演重要角色^[3]。在脊椎动物中,Wnt 信号通路至少通过三条不同的胞内信号转导途径,包括经典的 β -catenin 途径以及非经典的 Ca^{2+} 和平面细胞极性(planar cell polarity)途径^[4]。

经典 β -catenin 途径通过胞内 β -连环蛋白(β -catenin) 转导信号,当 Wnt 配体缺乏时,糖原合酶激酶(glycogen synthase kinase- β , GSK3 β)、轴蛋白(Axin)、结肠腺瘤样息肉(adenomatous polyposis coli, APC) 以及酪蛋白激酶 I α (casein kinase I α , CK I α) 组成 β -连环蛋白(β -catenin) 破坏复合体,将 β -catenin 磷酸化,再经泛素化后被蛋白酶体降解^[5]。相反,当 Wnt 蛋白与卷曲蛋白(frizzled, FZD) 及共同受体低密度脂蛋白相关蛋白-5 和 6(low-density lipoprotein-related protein-5 and 6, LRP-5 and 6) 结合时,Wnt 的经典信号转导途径被激活。上述复合体激活骨架蛋白 Dishevelled(Dvl),能阻止 β -catenin 破坏复合体的形成^[5]。随着胞内 β -catenin 浓度的升高,它将转位至细胞核内并与淋巴样增强子因子(Lymphoid Enhancer Factor),又称 T 细胞因子(T-cell factor, TCF) 家族的转录因子相结合,形成 LEF-TCF- β -catenin 复合体并激活目的基因的表达^[6]。

1.2 Dkks 分子的作用机制

Wnt 信号通路被胞外分子高度调节,其拮抗剂按照功能可以分为两大类:第一类包括分泌型的 Frizzled 相关蛋白(Frizzled-related protein, sFRP) 家族、Wnt 抑制因子-1(Wnt inhibitory factor-1, WIF-1) 和 Cerberus,均通过与 Wnt 蛋白结合阻止其与 FZD 受体家族结合而起作用,因而同时阻断经典和非经典通路^[7]。第二类即 Dickkopf(Dkk) 家族,由 Dkk-1, 2, 3, 4 以及 Dkk-3 相关基因 soggy 构成,通过与 Wnt 受体复合体中的 LRP5 和 LRP6 组分结合,从而抑制 β -catenin 经典转导途径^[8]。其中 Dkk1 通过与 LRP5 和 LRP6 共受体结合阻止 Wnt-Friz-

zled 复合体形成,或者与细胞表面受体 Kremen1 或 Kremen2 结合促进 LRP5 和 LRP6 内化,最终抑制 β -catenin 经典转导途径^[9]。

Dkk-1 最初发现于非洲爪哇蟾,是头部形成的诱导物,其时空表达被精细调控,并在介导上皮-间充质转化的组织内表达明显升高^[10]。早期口腔上皮及间充质中 Dkk1 的过表达导致 β -catenin 通路的抑制及牙齿形成停滞于蕾状期^[11]。类似地,敲除口腔上皮 β -catenin 基因的变异胚胎也有 50% 出现切牙基板的裂开^[12]。以上事实均表明 β -catenin 和 Dkk1 在间充质发育,牙齿形成过程中发挥重要作用。

2 Wnt 信号通路、Dkks 分子与牙齿发育的关系

2.1 Wnt 信号通路与牙齿发育的关系

众多研究表明,Wnt 信号通路在胚胎牙齿发育中扮演不可替代的角色。Sarkar 等^[13]用比较原位杂交方法发现,各时期发育中的大鼠牙齿均有 Wnts-3, 4, 5a, 6, 7b 和 10b 等分子表达,特别是在上皮组织里。同时,Wnt 的受体 *MFz6* 和拮抗剂/激动剂 *MFzrb1* 和 *MFrp2* 亦被证明在发育中的牙齿内表达^[13]。牙齿发育期间,核 β -catenin 分布于牙上皮和其下的间充质,经典 Wnt 通路的活化贯穿于牙形态发生各个时期,而口腔上皮中持续过度激活 β -catenin 通路可造成小鼠体内异位牙和持续的牙形成^[14]。在人类,Wnt10a 和 Axin2 功能的杂合缺失导致牙齿发育不全及其他外胚层缺陷。Han XL 等^[15]采用 2.3-kb Col 1a1 启动子构建 Dkk1 转基因小鼠,并使 Dkk1 基因定位过表达于牙髓组织和成牙本质细胞,结果发现,小鼠第一磨牙牙根缩短、牙髓/根管区域扩大、牙本质形成速率降低,第二磨牙缩小,第三磨牙缺如。类似地,敲除 *Lef-1* 基因的小鼠亦使牙齿发育停滞于蕾状期。另外,Wnt 信号通路在磨牙原发性和继发性釉结中的作用也通过上皮细胞过表达 Dkk 加以验证,当 Dkk 过表达定位于蕾状期时,继发性釉结和牙尖形成被扰乱^[13]。以上事实表明 Wnt 信号通路对于牙齿发育的各个时期均至关重要。

2.2 Wnt 信号通路在牙体组织形成细胞中的作用

Wnt 5a 的过表达抑制了人牙乳头细胞(human dental papilla cells, hDPC) 的增殖和迁移,经重组 Wnt 5a 刺激的 hDPC 发育相关转录因子包括

Runx2 表达增强,而 Wnt 6 则只上调 hDPC 的成骨相关基因,对其增殖并无显著作用^[16]。Dkk1 过表达小鼠则表现为未成熟成牙本质细胞增多,成熟者少见,牙本质小管数量大大减少^[15]。Yamashiro 等^[17]报道,Wnt 10a 与成牙本质细胞的分化相关性很高,高度定位于表达牙本质涎磷蛋白的成牙本质细胞中。Wnt 1 通过抑制碱性磷酸酶活性及矿化结节形成而负性调节牙髓干细胞向成牙本质样细胞分化,表明牙本质形成受 Wnt 分子时空表达的精密调控。

2.3 Wnt 信号通路在牙齿模式化中的作用

Liu 等^[14]证实口腔上皮中 β -catenin 的持续活化导致过大畸形牙和异位牙形成,而阻断该通路造成继发性釉结发育的阻滞及磨牙牙尖变钝。哺乳动物的牙列形成有一定的排列,切牙在下颌突的远端区域发育,而磨牙位于近端区域。有研究表明:Dkk 1 只在下颌突远端区域即切牙区的口腔外胚层和间充质表达,提示 Dkk 1 信号通路可能在牙齿模式化中起作用^[18]。这些表达模式与 Bmp 4, Islet 1 和 Msx 1 等基因的表达模式相关联,而这些基因均为发育中的切牙区域标记并可能调控牙齿模式化^[19]。另外 Dkk 1 控制远端肢体的模式化,以及其表达能被 BMP 4 活化也支持了上述功能^[20]。

2.4 Dkks 在牙齿形态发生中的作用

在磨牙形态发生过程中,Dkk 3 特异性地表达于原发性釉结和继发性釉结信号中心^[21]。原发性釉结在磨牙特异性可折叠形态发生的启动中起重要作用,而继发性釉结则控制牙尖的数目和模式化。有研究表明,当培养于宿主小鼠的肾组织内时,磨牙胚形成 4 个或更多,而对照组为 3 个^[22]。另外,有研究表明在釉结中表达的 Wnt 信号调节分子 Axin 2 亦在牙齿形态发生中发挥重要作用^[23]。在 Epiprofin 敲除小鼠中也观察到异位牙,并伴有 Wnt 信号上调,表现为 Wnt 的目的基因 Lef-1 表达增强,类似于 Lef-1 过表达的小鼠模型^[24]。因此,在上皮信号中心的 Wnt 通路调节可能在牙齿形态发生的调控中起到关键作用,同时牙齿间充质中 Dkk 的表达说明组合式的 Dkk 表达域可能也有助于解释组织中 Wnt 信号的时空效应^[18]。

2.5 Dkks 在牙冠钙化中的作用

成釉细胞和成牙本质细胞的分化以及随后牙本质和釉质的形成,受牙乳头和内层牙上皮细胞之

间的上皮-间充质相互作用所调控,该过程涉及信号分子的活动。研究发现 DKK 1 不仅在发育中的下颌骨中表达,还在前成牙本质细胞中表达上调并延续至第二期成牙本质细胞。相反,Dkk 3 只在分泌釉基质的成釉细胞中瞬时表达^[18]。有证据表明 Wnt 信号通路及其被 Dkk 分子的调控在骨形成中发挥作用,受经典 Wnt 通路上调的 Dkk 2 分子被证明在晚期成骨分化特别是矿化基质的形成中起关键作用^[25-27]。另外,Wnt 3 在牙齿上皮中的过表达导致出生后切牙中成釉细胞的缺失以及釉质的减少,提示 Wnt 通路在釉质形成中的作用^[28]。因此,Dkk 分子可能涉及成釉细胞和成牙本质细胞的分化以及之后牙体硬组织的形成。总之,牙齿发育过程中 Dkk-1, 2, 3 的动态表达提示 Dkk 调控的 Wnt 信号通路在牙齿模式化和牙齿形成的过程中起到重要作用。

3 结语

综上所述,Wnt 信号通路及其调控因子 Dkks 在启动牙胚发育,传递上皮-间充质间作用信号和调控牙齿形态发生、模式化和钙化成熟等过程中均发挥了重要作用,提示可以通过小分子激动剂或拮抗剂来调控 Wnt 通路的时空表达,从而影响牙齿发育过程。近年来大量相关研究成果既为揭示牙齿发生发育的分子机制提供了重要线索,也为临床运用牙再生等组织工程技术带来了新的机遇与挑战。另外,进一步了解 Wnt 通路作用下牙齿发育或再生的生物学背景,亦有助于新疗法的发展。

参考文献:

- [1] Kavitha B, Priyadharshini V, Sivapathasundharam B, et al. Role of genes in oro-dental diseases [J]. *Indian J Dent Res*, 2010, 21 (2): 270-274.
- [2] Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (57): 7469-7478.
- [3] van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development [J]. *Development*, 2009, 136 (19): 3205-3214.
- [4] Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors [J]. *J Biol Chem*. 2006, 281 (32): 22429-22433.
- [5] Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease [J]. *Cell*, 2006, 127 (3): 469-480.
- [6] Liu F, Millar SE. Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease [J]. *J Dent Res*, 2010, 89 (4): 318-

- 330.
- [7] Bovolenta P , Esteve P , Ruiz JM , *et al.* Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled – related proteins in development and disease [J]. *J Cell Sci* , 2008 , 121 (Pt 6) : 737 – 746.
- [8] Bilic J , Huang YL , Davidson G , *et al.* Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled – dependent LRP6 phosphorylation [J]. *Science* , 2007 , 316 (5831) : 1619 – 1622.
- [9] Williams BO , Insogna KL. Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone [J]. *J Bone Miner Res* , 2009 , 24 (2) : 171 – 178.
- [10] Korol O , Gupta RW , Mercola M. A novel activity of the Dickkopf – 1 amino terminal domain promotes axial and heart development independently of canonical Wnt inhibition [J]. *Dev Biol* 2008 , 324 (1) : 131 – 138.
- [11] Chen J , Lan Y , Baek JA , *et al.* Wnt/beta – catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development [J]. *Dev Biol* , 2009 , 334 (1) : 174 – 185.
- [12] Fujimori S , Novak H , Weissenbock M , *et al.* Wnt/beta – catenin signaling in the dental mesenchyme regulates incisor development by regulating Bmp4 [J]. *Dev Biol* , 2010 , 348 : 97 – 106.
- [13] Sarkar L , Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development [J]. *Mech Dev* , 1999 , 85 (1 – 2) : 197 – 200.
- [14] Liu F , Chu EY , Watt B , *et al.* Wnt/beta – catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis [J]. *Dev Biol* , 2008 , 313 (1) : 210 – 224.
- [15] Han XL , Liu M , Voisey A , *et al.* Post – natal effect of overexpressed DKK1 on mandibular molar formation [J]. *J Dent Res* , 2011 , 90 (11) : 1312 – 1317.
- [16] Peng L , Dong G , Xu P , *et al.* Expression of Wnt5a in tooth germs and the related signal transduction analysis [J]. *Arch Oral Biol* , 2010 , 55 (2) : 108 – 114.
- [17] Yamashiro T , Zheng L , Shitaku Y , *et al.* Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis [J]. *Differentiation* , 2007 , 75 (5) : 452 – 462.
- [18] Fjeld K , Kettunen P , Furmanek T , *et al.* Dynamic expression of wnt signaling – related dickkopf1 , – 2 , and – 3 mRNAs in the developing mouse tooth [J]. *Dev Dyn* , 2005 , 233 (1) : 161 – 166.
- [19] Mitsiadis TA , Angeli I , James C , *et al.* Role of Islet1 in the patterning of murine dentition [J]. *Development* , 2003 , 130 (18) : 4451 – 4460.
- [20] Grotewold L , Ruther U. The Wnt antagonist Dickkopf – 1 is regulated by Bmp signaling and c – Jun and modulates programmed cell death [J]. *EMBO J* , 2002 , 21 (5) : 966 – 975.
- [21] Cho SW , Kim JY , Cai J , *et al.* Temporospatial tissue interactions regulating the regeneration of the enamel knot in the developing mouse tooth [J]. *Differentiation* , 2007 , 75 (2) : 158 – 165.
- [22] Jarvinen E , Salazar – Ciudad I , Birchmeier W , *et al.* Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelia Wnt/beta – catenin signalling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2006 , 103 (49) : 18627 – 18632.
- [23] Lammi L , Arte S , Somer M , *et al.* Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer [J]. *Am J Hum Genet* , 2004 , 74 (5) : 1043 – 1050.
- [24] Nakamura T , Vega SD , Fukumoto S , *et al.* Transcription factor epiprofin is essential for tooth morphogenesis by regulating epithelial cell fate and tooth number [J]. *J Biol Chem* , 2007 , 283 (8) : 4825 – 4833.
- [25] Akiyama H , Lyons JP , Mori – Akiyama Y , *et al.* Interactions between Sox9 and beta – catenin control chondrocyte differentiation [J]. *Genes Dev* , 2004 , 18 (9) : 1072 – 1087.
- [26] MacDonald BT , Adamska M , Meisler MH. Hypomorphic expression of Dkk1 in the double ridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6 [J]. *Development* , 2004 , 131 (11) : 2543 – 2552.
- [27] Li XF , Liu P , Liu WZ , *et al.* Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation [J]. *Nat Genet* , 2005 , 37 (9) : 945 – 952.
- [28] Millar SE , Koyama E , Reddy ST , *et al.* Over – and ectopic expression of Wnt3 causes progressive loss of ameloblasts in postnatal mouse incisor teeth [J]. *Connect Tissue Res* , 2003 , 44 (Suppl 1) : 124 – 129.

(上接 283 页)

- [12] Wang Y , Darvell BW. Failure mode of dental restorative materials under Hertzian indentation [J]. *Dental Mater* , 2007 , 23 : 1236 – 1244.
- [13] Wakabayashi N , Anusavice KJ. Crack initiation modes in bilayered alumina/porcelain disks as a function of core/veneer thickness ratio and supporting substrate stiffness [J]. *J Dent Res* , 2000 , 79 (6) : 1398 – 1404.
- [14] Fleming G , Dickens M , Thomas LJ *et al.* The *in vitro* failure of all – ceramic crowns and the connector area of fixed partial dentures using bilayered ceramic specimens: the influence of core to dentin thickness ratio [J]. *Dent Mater* , 2006 , 22 (8) : 771 – 777.
- [15] Fleming G , El – Lakwah SF , Harris JJ , *et al.* The effect of core: dentin thickness ratio on the bi – axial flexure strength and fracture mode and origin of bilayered dental ceramic composites [J]. *Dent Mater* , 2005 , 21 (2) : 164 – 171.
- [16] Thompson GA. Influence of relative layer height and testing method on the failure mode and origin in a bilayered dental ceramic composite [J]. *Dental Mat* , 2000 , 16 : 235 – 243.