

# Wnt 信号通路在牙齿发育不同阶段作用的研究进展

吴也可 韩向龙 白丁\*

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

[中图分类号] R783.5 [文献标识码] A [文章编号] 1671-7651(2014)01-0082-03

牙齿发育起始于神经嵴来源的外胚上皮和外胚间充质细胞间相互的信号作用<sup>[1]</sup>。牙齿形成早期由口腔上皮的增厚并陷入其下间充质内, 然后浓缩并形成牙蕾。近二十年来, 众多信号分子和转录因子被证实上述作用中起关键作用, 其中 Wnt 信号通路对复杂细胞行为不可替代的调控作用贯穿于整个机体发育过程<sup>[2]</sup>。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, 在胚胎发育过程中调控细胞生长、发育、迁移、分化, 维持干细胞多向分化能力并决定组织极性<sup>[3]</sup>。Wnt 信号通路包括经典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径以及非经典的 Wnt/ $Ca^{2+}$  和 Wnt/平面细胞极性(Wnt/planar cell polarity)途径<sup>[3,4]</sup>。

本文旨在将近年来国内外有关 Wnt 信号通路在哺乳动物牙齿胚胎时期和出生后发生发育的各个阶段中所起作用及相关分子生物学机制的最新研究进展作一综述, 为进一步理解牙齿发育和发育相关疾病的分子机制, 以及牙再生和牙修复的方案制定提供新的思路。

## 1 Wnt 信号通路在初始阶段牙胚中的作用

多种 Wnt 家族成员在小鼠牙齿发育初始阶段均有表达, 比如 Wnt10b 特异性表达于磨牙和切牙上皮增厚区, Wnt5a 和 Wnt 的激动剂/拮抗剂 MFzbl 和 Mfrp2 按近-远中方向梯度表达于间充质细胞, Wnt4、Wnt6、Wnt 受体 MFz6 在面部、口腔和牙齿上皮均有表达, Wnt3 和 Wnt7b 在口腔上皮表达, 但在牙上皮中缺失<sup>[5]</sup>。Fjeld K 等<sup>[6]</sup>报道牙列启动阶段 Dkk-1、2、3 在上、下颌突的间充质、口腔外胚层也有不同程度的表达。组织重组实验表明上皮源性的 Wnt4 诱导牙间充质表达 Sema3a 分子, 该分子及其受体 Npn1 继而引导三叉神经轴突与牙齿建立突触联系<sup>[7]</sup>。下颌弓口腔外胚层中异位表达的 Wnt7b 下调了牙外胚层 Shh 及其下外胚间充质 Shh 的效应子/目的基因 Patched 的表达, 牙齿发育随之停滞, 提示 Wnt7b 对 Shh 的抑制作用保持了口腔和牙外胚层间的界限<sup>[8]</sup>。然而, 这些实验并未找到异位表达的 Wnt7b 所激活的信号通路。体内发育中的磨牙的

经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路已被下述几种方法所模拟: 1) 核  $\beta$ -catenin 免疫染色; 2) 使用含有多个 LEF/TCF 结合部位(位于最小启动子和 lacZ 报告子上游)的 Wnt 报告子; 3) 在内源性 Axin2 位点敲入 Wnt 目的基因 lacZ<sup>[9,10]</sup>。另外, 观察到具有活化而稳定的上皮  $\beta$ -catenin 突变或胞内 Wnt 拮抗剂 APC 有纯合无效突变的胚胎中存在持续的异位牙发育<sup>[9,11]</sup>。综上所述, Wnt 信号通路在牙齿发生中起重要的促进作用。

## 2 Wnt 信号通路在蕾状期牙胚中的作用

在蕾状期, Wnt/ $\beta$ -catenin 报道基因的表达表明 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号在牙上皮及间充质细胞中较为活跃<sup>[10]</sup>。牙发生启动后短期内, 过表达上皮内分泌性 Wnt 抑制物 DKK1 能抑制牙上皮和间充质中的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号, 使牙发育停滞在蕾状早期, 而沉默上皮  $\beta$ -catenin 产生相对较轻的表型<sup>[9]</sup>。沉默口腔间充质中的  $\beta$ -catenin 阻碍牙齿发育从蕾状期向帽状期过渡<sup>[9]</sup>。这些结果均表明牙齿发育早期 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号的必要性。表达 Dkk1 的胚胎中牙齿发育的阻滞可能是由 Bmp4 及其目的基因 Msx1 和 Msx2 表达的丧失造成的, 因为在 Dkk1 过表达和 Msx1<sup>-/-</sup>; Msx2<sup>-/-</sup> 的胚胎中观察到相似表型<sup>[12]</sup>。另外,  $\beta$ -catenin 对牙间充质中 Lef1 和 Fgf3 的表达以及上皮中原发性釉结的诱导是必需的, 表明  $\beta$ -catenin 信号在发育牙齿中上皮和间充质区域内的重要作用<sup>[12]</sup>。值得一提的是, Wnt 在上皮和间充质中激活的众多基因相互毗邻, 提示原发性釉结中表达的 Wnt10a、Wnt10b、Wnt6、Wnt3 以及邻近间充质中表达的 Wnt5a 间可能存在交互串话。Hjalt 等<sup>[12]</sup>报道发育牙蕾的牙上皮中  $\beta$ -catenin 和 Lef1 的表达与牙齿发育的关键转录因子 PITX2 相重叠, 其中 Lef1 的表达受 PITX2、LEF1 和  $\beta$ -catenin 间直接的生理性相互作用调控, PITX2 增强  $\beta$ -catenin 依赖的 Lef1 异形体的内源性表达, 同时降低了 N-端缩短  $\beta$ -catenin 非依赖性异形体的表达<sup>[13]</sup>。在小鼠体内靶向抑制 Lef1 基因导致牙齿发育停滞于蕾状期, 稍晚于 Dkk1 过表达的胚胎, 阻滞时期的不同可能源于牙齿发育中 LEF1 相对于 LEF/TCF 家族其他成员过剩。野生型和 Lef1<sup>-/-</sup> 胚胎的发育中牙齿上皮和间充质的重组实验表明 LEF1 只是瞬时地以组织非自主的方式在上皮中需要<sup>[13]</sup>。作为 LEF1 的直接转录靶标, Fgf4 在上皮 Shh 表达之后反过来诱导牙间充质 Fgf3 的表达, 提示上皮和间充质间有序的

基金项目 国家自然科学基金(编号:31000419)

四川省科技厅科技支撑项目资助(编号:2010SZ0174)

作者简介 吴也可(1987~), 男, 成都人, 博士, 主要从事口腔正畸学临床及基础的研究工作。

\* 通讯作者 白丁, E-mail: baiding@scu.edu.cn

交互过程。Lef1 的缺失也导致牙上皮细胞难以存活<sup>[14]</sup>。相反,上皮内 Lef1 的过表达能引发转基因动物唇裂中上皮细胞的陷入,形成毛囊和向牙齿细胞分化<sup>[15]</sup>。

### 3 Wnt 信号通路在帽状期牙胚中的作用

在帽状早期, Lef1、Wnt3、Wnt6、Wnt10b 和 MFz6 均能在发育牙齿的临时性信号中心原发性釉结中检测到, Wnt5a 和 MFz6 则在牙乳头间充质强烈表达<sup>[5]</sup>。相反, Wnt 抑制物 Dkk 家族未在釉结中表达,但在发育牙齿及其周围口腔间充质中的表达均有所上调<sup>[6]</sup>。与此一致, Wnt/ $\beta$ -catenin 报告基因的表达和核  $\beta$ -catenin 的免疫染色表明 Wnt/ $\beta$ -catenin 在釉结中活跃表达<sup>[9,10]</sup>,  $\beta$ -catenin 的信使 RNA 也显著上调<sup>[9]</sup>。在含有活化稳定上皮  $\beta$ -catenin 突变的突变胚胎中, 釉结从牙上皮中发芽以形成额外牙, 提示  $\beta$ -catenin 信号通路是釉结形成的上游激活物<sup>[16]</sup>。

### 4 Wnt 信号通路在钟状期牙胚中的作用

继发性釉结为种属特异性牙尖模式提供了最早期的形态学指向。牙尖模式化始于小鼠和田鼠磨牙发育的帽状晚期, 早于牙尖发育的形态学证据<sup>[17]</sup>。这样, 可以认为调控牙尖相对位置的分子信号在原发性釉结凋亡时就立即激活了。与这个预期的模式化一致, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号在发育中的继发性釉结中活跃<sup>[9,10]</sup>。用 Wnt 抑制物 MFRZB1 治疗磨牙胚移植, 然后移植到肾被膜进一步发育, 导致牙齿体积减小、牙尖变钝, 提示 Wnt 信号调控磨牙牙齿大小和牙尖的发育<sup>[18]</sup>。同样, 从帽状期开始诱导 Dkk1 在口腔和牙上皮过表达导致钝的磨牙尖形成, 釉结标志 p21 的下调, 以及 Sostdc1 基因表达上调。该基因通常不在釉结中表达, 并以环境依赖的方式调控 Wnt 和 BMP 通路<sup>[19]</sup>。与 Wnt 和 BMP 信号调控牙尖模式化的作用相似, 缺少 Sostdc1 的小鼠变异体的磨牙含有增大的釉结和额外的牙尖<sup>[20]</sup>。这些实验结果表明 Wnt 活性对于继发性釉结的维持是必要的, 并提示该通路的严密调控对控制个体牙齿外形是至关重要的<sup>[9]</sup>。

### 5 Wnt 信号通路在分泌期牙胚中的作用

Wnt10a 在分泌性成牙本质细胞中表达, 并与牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP), 一种调控牙本质矿化的牙齿特异性的非胶原基质蛋白共聚集。体外数据分析提示 Wnt10a 是 DSPP 表达的上游调节蛋白, 细胞-基质相互作用对于 DSPP 的表达至关重要<sup>[21]</sup>。牙上皮中 Wnt3 的过度表达造成成釉细胞的丧失以及出生后切牙中釉质的减少, 提示 Wnt 通路的抑制可能在釉质形成中起作用<sup>[22]</sup>。与此一致, Dkk1 在前成牙本质细胞和分泌性成牙本质细胞中明显上调, Dkk3 于釉基质分泌前在成釉细胞中短暂表达<sup>[6]</sup>。Dkk1 过表达小鼠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<sup>[23]</sup>。

### 6 Wnt 信号通路在出生后牙齿发育中的作用

通常认为赫特维希上皮根鞘(Hertwig's epithelial root sheath, HERS)对于牙根发育十分重要。Syndecan-1 是细胞表面一种增强 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的硫酸乙酰肝素糖蛋白, 在 HERS 细胞有所表达<sup>[24]</sup>。牙骨质的形成对于细

胞内外的磷酸盐/焦磷酸盐分布敏感, 用无机磷酸盐治疗永生化的小鼠成牙骨质细胞可以改变 Wnt 通路基因的表达: 分泌性经典 Wnt 通路抑制物 Sfrp4 表达增强, 抑制物 Wif1 和 Dkk3 的表达以及 Wnt10b 和 Wnt4 配体减少<sup>[25]</sup>。Sfrp4 已被证实是一种潜在的循环性调磷因子, 调控磷的浓度<sup>[26]</sup>。这些数据提示 Wnt 信号可能与牙骨质形成有关。不同于磨牙, 啮齿动物的切牙连续萌出, 该过程可能依赖于颈环干细胞池。Wnt/ $\beta$ -catenin 通路活性在出生后切牙的间充质和上皮细胞中可以检测到<sup>[10]</sup>。有趣的是, 颈环却没有 Wnt 通路活性, 相对于其控制几种其他再生性上皮细胞比如毛囊和肠干细胞的功能, Wnt/ $\beta$ -catenin 通路不直接调控切牙干细胞的增殖和自我更新。

综上所述, Wnt 信号通路在牙胚发育的启动期、蕾状期、帽状期、钟状期、分泌期及出生后牙齿发育等各个阶段均发挥了重要作用, 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。

### 参考文献

- [1] Thesleff I. The genetic basis of tooth development and dental defects [J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(23): 2530-2535
- [2] Croce JC, McClay DR. Evolution of the Wnt pathways [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 469: 3-18
- [3] Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development [J]. *Genes Dev*, 1997, 11(24): 3286-3305
- [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] Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development [J]. *Mech Dev*, 1999, 85(1-2): 197-200
- [6] 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): 161-6
- [7] Kettunen P, Loes S, Furmanek T, et al. Coordination of trigeminal axon navigation and patterning with tooth organ formation: epithelial-mesenchymal interactions, and epithelial Wnt4 and Tgfbeta1 regulate semaphorin 3a expression in the dental mesenchyme [J]. *Development*, 2005, 132(2): 323-334
- [8] Sarkar L, Cobourne M, Naylor S, et al. Wnt/ Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(9): 4520-4524
- [9] 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
- [10] Lohi M, Tucker AS, Sharpe PT. Expression of Axin2 indicates a role for canonical Wnt signaling in development of the crown and root during pre- and postnatal tooth development

- [J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(1) : 160–167
- [11] Kuraguchi M, Wang XP, Bronson RT, et al. Adenomatous polyposis coli (APC) is required for normal development of skin and thymus [J]. *PLoS Genet*, 2006, 2(9) : e146
- [12] Hjalt TA, Semina EV, Amendt BA, et al. The Pitx2 protein in mouse development [J]. *Dev Dyn*, 2000, 218(1) : 195–200
- [13] Amen M, Liu X, Vadlamudi U, et al. PITX2 and beta-catenin interactions regulate Lef-1 isoform expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(21) : 7560–7573
- [14] Kratochwil K, Dull M, Farinas I, et al. Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development [J]. *Genes Dev*, 1996, 10(11) : 1382–1394
- [15] Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, et al. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in Lef1(-/-) mice [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(24) : 3173–3185
- [16] Jarvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, et al. Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 : 18627–18632
- [17] Keranen SV, Aberg T, Kettunen P, et al. Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents [J]. *Dev Genes Evol*, 1998, 208 (9) : 477–486
- [18] Sarkar L, Sharpe PT. Inhibition of Wnt signaling by exogenous Mfrzb1 protein affects molar tooth size [J]. *J Dent Res*, 2000, 79 (4) : 920–925
- [19] Itasaki N, Jones CM, Mercurio S, et al. Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling [J]. *Development*, 2003, 130(18) : 4295–4305
- [20] Kassai Y, Munne P, Hotta Y, et al. Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin [J]. *Science*, 2005, 309 (5743) : 2067–2070
- [21] 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
- [22] 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]. *Connective Tissue Res*, 2003, 44 (Suppl 1) : 124–129
- [23] Han XL, M. Liu, A. Voisey, et al. Post-natal effect of overexpressed DKK1 on mandibular molar formation [J]. *J Dent Res*, 2011, 90(11) : 1312–1317
- [24] Liu BY, Kim YC, Leatherberry V, et al. Mammary gland development requires syndecan-1 to create a betacatenin/TCF-responsive mammary epithelial subpopulation [J]. *Oncogene*, 2003, 22(58) : 9243–9253
- [25] Rutherford RB, Foster BL, Bammler T, et al. Extracellular phosphate alters cementoblast gene expression [J]. *J Dent Res*, 2006, 85(6) : 505–509
- [26] Berndt T, Craig TA, Bowe AE, et al. Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(5) : 785–794
- [收稿日期:2012-03-30] (本文编辑 汪喻忠)

## (上接 81 页)

- [19] Naobumi Hosoganea, Zhiping Huang, Bernard A. Rawlinsb, et al. Stromal derived factor-1 regulates bone morphogenetic protein 2-induced osteogenic differentiation of primary mesenchymal stem cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(7) : 1132–1141
- [20] Paul Thevenot, M. Sc., Ashwin Nair, et al. The Effect of Incorporation of SDF-1 $\alpha$  into PLGA Scaffolds on Stem Cell Recruitment and the Inflammatory Response [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(14) : 3997–4008
- [21] Ratanavaraporn J, Furuya H, Kohara H, et al. Synergistic effects of the dual release of stromal cell-derived factor-1 and bone morphogenetic protein-2 from hydrogels on bone regeneration [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(11) : 2797–811
- [22] Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene [J]. *Genomics*, 1995, 28(3) : 495–500
- [23] Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells [J]. *Cell*, 2006, 124 : 175–89
- [24] Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1 [J]. *Nature*, 1996, 382 : 635–638
- [25] Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, et al. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development [J]. *Nature*, 1998, 393 : 595–599
- [26] Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home [J]. *Blood*, 2005, 106 : 1901–1910
- [27] JACEK KIJOWSKI, MONIKA BAJ-KRZYWORZEKA, MARCIN MAJKA, et al. The SDF-1-CXCR4 Axis Stimulates VEGF Secretion and Activates Integrins but does not Affect Proliferation and Survival in Lymphohematopoietic Cells [J]. *Stem Cells*, 2001, 19 : 453–466
- [收稿日期:2012-10-25] (本文编辑 汪喻忠)