

# 经典 Wnt 信号通路在牙齿发育中的研究新进展 \*

王 也 李汉梁 林丽娣 林 鑫 王冰梅<sup>△</sup>

(福建省福建师范大学旗山校区 福建 福州 350108)

**摘要:** 经典 Wnt 信号通路是参与胚胎及器官发育的四大信号传导途径之一, 在牙齿发育中扮演了重要的角色。本文对其中的  $\beta$ -catenin, Lef1, Apc, Axin2 这 4 个关键因子在牙齿发育中研究的新进展做了简要的概述  $\beta$ -catenin 在间充质中会调控多个信号, 影响牙上皮和间充质相互作用, Lef1 会和 Tcf 家族一道调控上皮细胞命运; Apc 能抑制多余牙齿的形成; Axin2 在牙晚期发育中影响牙本质的形成。通过这些因子的研究, 希望人们能在牙齿再生等生物医学工程上有新的突破。

**关键词:** Wnt; 牙齿发育;  $\beta$ -catenin

**中图分类号:** R78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)13-2575-03

## Recent advances About Canonical Wnt Pathway in Tooth Development\*

WANG Ye, LI Han-liang, LIN Li-di, LIN Xin, WANG Bing-mei<sup>△</sup>

(Fujian normal University Qi shan Campus Science and Engineering Building 10#402 Fuzhou 350108 China)

**ABSTRACT:** Canonical Wnt signaling pathway is one of the main four categories of signal transduction pathway involving in embryo and organ development. It also plays an important role in the tooth development. In this paper, we briefly write an overview about the new research of  $\beta$ -catenin, Lef1, Apc, Axin2 in tooth development:  $\beta$ -catenin affects the interaction between epithelium and mesenchyme by regulating other signals; the LEF/TCF complex can regulate the fate of dental epithelium cell; Apc inhibits supernumerary tooth formation during embryo genesis; and Axin2 has the influence of development of the crown and root during pre- and postnatal tooth development. So here we hope it may bring a new breakthrough among tooth regeneration and other bioengineerings.

**Key words:** Wnt; Tooth development;  $\beta$ -catenin

**Chinese Library Classification(CLC):** R78 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2011)13-2575-03

经典的组织重组实验证明, 哺乳动物牙齿的早期发育经历了一个上皮与间充质的相互诱导过程。在小鼠中胚胎发育过程中, 牙齿的发育起源于胚胎期 11 天左右的口腔上皮增厚。在胚胎期 12 天到 13 天左右, 预定生成的牙上皮细胞增殖, 下陷至下方的间充质细胞中, 并且诱导上皮牙蕾周围神经嵴细胞来源的间充质细胞聚集。在胚胎期 13.5 天时, 牙蕾上皮顶部的细胞会形成一个能分泌多种生长因子的信号中心, 一般称之为釉结节。随后, 牙上皮继续内陷, 分别在胚胎期 14.5 天和 15.5 天形成“帽状”和“钟状”结构。随着发育的继续, 上皮细胞和邻近的间充质细胞分别分化成产釉的成釉细胞和产牙本质的成牙本质细胞<sup>[1]</sup>。

有许多生长因子参与了牙齿发育的信号调控, 研究相对热门的有成纤维细胞生长因子 (Fgf)、骨形态发生蛋白(Bmp)、刺猬家族蛋白(Shh)以及 Wnt 信号系统 Wnt 信号通路在早期的牙齿发育中扮演了重要的角色。一般来说 Wnt 信号分为三种: 经典 Wnt 信号通路 (canonical wnt pathway); 平行极性 Wnt 信号通路 (planar polarity pathway) 以及 Wnt/ 钙离子通路 (Wnt/Ca2 pathway)。经典 Wnt 信号通路包括了  $\beta$ -catenin 的稳定和核内聚集。当胞外缺少 Wnt 蛋白时, 胞内的  $\beta$ -catenin 会被丝氨酸/苏氨酸激酶的 GSK-3 $\beta$  蛋白磷酸化, 胞内蛋白 Ax-

in 和 Apc 也形成复合物, 降解磷酸化的  $\beta$ -catenin。这样,  $\beta$ -catenin 无法聚集, 因而无法启动核内下游转录。当 Wnt 信号激活后,  $\beta$ -catenin 的磷酸化受到影响, 得以稳定并聚集进入细胞核内, 随后将 TCF/Lef 家族的 DNA 结合蛋白从抑制子转化为激活子, 从而启动下游基因的转录<sup>[2-3]</sup>。

$\beta$ -catenin, Lef1, Apc, Axin2 在经典 Wnt 信号通路中占有举足轻重的地位。因此, 接下来将重点介绍这几个因子在小鼠早期牙齿发育中的研究进展。

### 1 $\beta$ -catenin 在牙齿发育中起重要作用

$\beta$ -catenin 是经典 Wnt 信号通路的一个关键因子。Fei Liu 等发现 Wnt/ $\beta$ -catenin 在牙齿发育的多个阶段都显著激活。 $\beta$ -catenin 的突变激活口腔上皮, 产生了超大的, 异位的牙齿, 以及异常形状的牙蕾, 一些牙齿发育中的重要信号分子的表达也增强了。形态结构的关键调控因子诸如 Bmp4, Msx1 以及 Msx2 在胚胎中的表达下调了, 从而影响了阻断上皮和间充质中 Wnt 信号的抑制因子 Dkk1 的表达。上皮中敲除了  $\beta$ -catenin 之后, 上述类似的现象也可以产生, 这说明了牙上皮的发育需要 Wnt 信号。在蕾状期对 Dkk1 进行诱导之后, 发现会产生不锋利的牙齿的形态。釉结节标记物 p21 的表达下调,

\* 基金项目: 国家级实验教学示范中心项目(20091s025)

作者简介: 王也(1987-) 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 器官再生。电话: 13489990886, E-mail: fred7898@sina.com

<sup>△</sup>通讯作者: 王冰梅, E-mail: bmwang@fjnu.edu.cn

(收稿日期: 2010-12-08 接受日期: 2010-12-31)

而且 *ectodin* 的表达也严格下调了。这些数据都说明 *Wnt/β-catenin* 在牙齿形态学发生中是一个重要的上游信号,对牙板的发育,单个牙齿的形状都有严格的调控作用<sup>[4]</sup>。

Rulang Jiang, Jianquan Chen 等利用转基因小鼠在间充质中特异敲除 *β-catenin*<sup>[5]</sup>,结果发现牙齿发育停留在蕾状期,牙间充质中的 *Lef1* 和 *Fgf3* 需要 *β-catenin* 的诱导产生作用,同时在上皮发育过程中釉结节的诱导发生也离不开 *β-catenin*。*Msx1* 和 *Pax9*,两个分别调节 *Bmp* 和 *Fgf* 的牙间充质关键转录因子在 *β-catenin* 敲除鼠中并未受到影响。Rulang Jiang 又利用转基因小鼠在上颌板间充质中特异性的过表达 *β-catenin*<sup>[6]</sup>,结果发现突变小鼠上颌板间充质诱导了异位的上皮内陷,这种内陷形态与牙胚发育的蕾状期十分相似。但是由于上颌板间充质中缺少 *Msx1* 和 *Pax9*,异位的上皮内陷无法继续发育成类似牙胚帽状期的结构。这些结果都说明早期牙胚发育中上皮和间充质作用需要 *Wnt* 信号与 *Bmp* *Fgf* 等信号相互诱导,产生效应<sup>[7-8]</sup>。

近来, Sayumi Fujimori, Hermann Novak, 等发现, *Wnt/β-catenin* 在小鼠门牙的发育中是必需的,因为抑制 *β-catenin* 信号之后,部分小鼠出生后单侧门牙变成两颗。经过分子机理的研究发现,突变小鼠门牙间充质中的 *Bmp4* 信号有所下调。而这个下调亦导致了门牙上皮中的 *Shh* 信号减弱。有趣的是,单纯从门牙间充质中抑制 *Bmp4* 信号也会导致 *Shh* 信号的下调<sup>[9]</sup>。因此,在随后的发育中,由于关键因子 *Shh* 信号的阻断,牙上皮在此分裂成两个信号中心,进而导致多余门牙的形成<sup>[10]</sup>。

## 2 LEF1 是控制牙上皮细胞命运的一个重要因子

在胚胎发育过程中, *Lef/Tcf* 家族的 DNA 结合因子会形成转录调节物,同 *β-catenin* 一起调节 *Wnt* 信号,来控制细胞增殖,细胞内的连接,细胞生存和凋亡命运<sup>[11-12]</sup>。Yang Chai 等对 *Wnt* 信号中核内转录因子 *Lef1* 的研究发现,双敲除 *Lef1* 的小鼠牙齿发育会停留在蕾状期,而且 *Lef1* 会激活 *FGF* 信号通路,来调节上皮间充质的相互作用。在 *Lef1* 双敲型小鼠中,未发现在神经嵴来源的牙间充质中有聚集现象,且细胞增殖未受到改变。这表明在缺陷型小鼠中,神经嵴来源的细胞没有缺陷, *Lef1* 在牙齿形态发生中对多潜能神经嵴细胞的增殖周期没有影响。同时,也可观察到在牙上皮的细胞凋亡活性大大降低,而这种凋亡活性可通过过表达 *FGF4* 来挽救。上述现象可证明在牙形态发育中 *Lef1* 是牙上皮细胞的一个重要因子<sup>[13]</sup>。由此看来 *LEF1* 在牙齿发育中会调节上皮和间充质的相互作用,而在另一个分子层面, *LEF1* 可直接调节 *Fgf4* 的表达。*Fgf4* 是已知可调节牙间充质中的 *Fgf3* 以及牙上皮中 *Shh* 的一个重要基因。因此对 *Lef1* 基因的改变亦会影响到其他基因的表达<sup>[14]</sup>。

亦有研究表明, *Bmp4* 在癌细胞、肺、肢芽、和眼组织中会作为 *β-catenin/TCF/LEF* 复合物调节的直接靶基因<sup>[15-16]</sup>,并且 *β-catenin/TCF/LEF* 在体外实验中可激活并结合到 2.4Kb 的 *Bmp4* 启动子上<sup>[17-18]</sup>。因此, Sayumi Fujimori, Hermann Novak 等针对此发现 *Bmp4* 信号在 *TCF1/LEF1* 突变的小鼠门牙中有下调,而且在 *TCF1/LEF1* 基因双敲除的小鼠中下调极为明显。故 *LEF1* 在此协同 *TCF1* 及 *β-catenin* 直接调节小鼠门牙间充质中 *BMP4* 信号,而 *Bmp4* 信号随后影响上皮中 *Shh* 蛋白的表

达,进而间接控制了牙上皮细胞命运。

## 3 Apc 是抑制产生多余牙齿的一个关键因子

*Apc* 能结合到 *β-catenin*, *Axin* 和糖原合成激酶 *3β* (*GSK3β*),促进 *β-catenin* 被 *GSK3β* 磷酸化。磷酸化的 *β-catenin* 经过蛋白酶体依赖性的降解,从而抑制 *Wnt* 信号通路<sup>[19]</sup>。Xiu-Ping Wang 等发现,在鼠胚口腔上皮中抑制 *APC* 的作用或者稳定 *β-catenin*,都能产生多余的牙齿。在下颌部产生的多余牙齿可以矿化,生成血管、神经,并且生成牙根,甚至在缺少 *Apc* 功能或者激活 *β-catenin* 的情况下,成年鼠的牙组织部分也能形成新的牙齿,当然在此过程中 *Apc* 的缺失受到了 *β-catenin* 的调节。*Apc* 功能缺失的细胞有足够能力诱导野生型牙上皮和间充质细胞参与形成新的牙齿<sup>[20]</sup>。

令人惊讶的是, *Msx1* 作为内源性牙齿发育的关键基因,在多余牙齿形成的过程中却无法发挥作用。前人研究中发现,在 *Msx1* 敲除小鼠中牙齿发育停滞在蕾状期<sup>[21]</sup>。敲除掉 *Apc* 的小鼠同样能使 *Msx1* 功能缺失,但是牙齿能顺利通过蕾状期,并且 *Msx1* 的下游基因 *Bmp4* 和 *Fgf3* 在多余牙齿中的表达亦不受影响。所以牙齿对 *Msx1* 的依赖可因 *Wnt* 信号的激活而解除。

同时作者也检测到了牙齿关键基因 *Fgf8* 也是 *Wnt/β-catenin* 信号的一个靶基因。虽然超额数量牙齿究竟是由激活的口腔上皮还是由间充质诱导的仍不得而知,但是作者发现了牙源性的程序一经启动, *Wnt* 信号在此就会起一个转化作用,这个转化作用控制了从牙分化时期到牙根形成时期超额数量牙齿的形成。这也说明, *Apc* 是一个较典型的内源性抑制因子,在牙发育过程中抑制了过多牙齿的形成<sup>[22]</sup>。

## 4 Axin2 在牙晚期发育和牙本质发育中起重要作用

*Axin2* 在 *Wnt* 信号途径中有 2 个作用:其一,与 *Axin1* 相似,都是在细胞质中通过降解 *β-catenin* 而达到抑制 *Wnt* 信号的作用;其二, *Axin2* 亦直接对 *Wnt* 信号产生一个负反馈调节作用<sup>[23-24]</sup>。Paul T. Sharpe 等利用 TOPgal 和 BATgal 两种报告小鼠研究经典 *Wnt* 信号通路拮抗物 *Axin2* 在牙齿发育中的表达。可以发现随着牙齿发育的进行, *Axin2* 先在初级釉结节和次级釉结节及它们下方的间充质表达;小鼠出生后, *Axin2* 主要在发育中的牙本质、牙乳头和发育中的牙根区域表达,而在成釉细胞和磨牙齿冠的无釉质区域中未检测到 *Axin2* 的表达。以上结果表明经典 *Wnt* 信号通路拮抗物 *Axin2* 在晚期牙齿发育中的釉质成型和牙根发育有重要的作用<sup>[25]</sup>。

在前人的研究中,一般都是对小鼠牙齿早期发育进行研究,很少对出生后的鼠牙齿基因做出检测。Paul T. Sharpe 等在此对分化期牙齿发育进行检测,结果印证了经典 *Wnt* 信号在成釉细胞的分化上没太大作用,只是保持了成釉细胞的增殖能力。而牙髓是间充质干细胞的一个储存库,这些间充质干细胞(DPSCs)日后可分化成牙本质细胞等。以往的研究表明, *Wnt* 信号会阻止牙髓干细胞的分化<sup>[26]</sup>,而 *Ain2* 蛋白活跃的细胞中, DPSCs 分化的几率大大降低。这也说明了在牙齿发育的晚期 *Axin2* 均一直在牙髓中有活跃表达,进而影响到牙本质的发育。

## 5 结语

经典 Wnt 信号是小鼠牙齿发育中比较重要的一类信号,  $\beta$ -catenin, Lef1, Apc, Axin2 亦是经典 Wnt 信号中的重要因子。如上所述, 无论是前期牙上皮和间充质的相互作用, 还是在后期的牙本质、牙根的发育, Wnt 信号都不可或缺。除此之外, Wnt 信号的缺失和变异也会对牙齿细胞增殖和凋亡、形态发生及其它信号通路等造成重大影响。因此, Wnt 信号在牙齿发育中占重要的地位, 对这一信号的研究会在牙齿形成的分子机制以及牙齿再生等医学工程上带来突破性进展。

### 参考文献(References)

- [1] Thesleff I., Hurmerinta K. Tissue interactions in tooth development. [J]. Differentiation, 1981, 18: 75-88
- [2] Renée van Amerongen, Roel Nusse. Towards An integrated view of Wnt signaling in development. [J]. Development, 2009, 136: 3205-3214
- [3] Ken M. Cadigan and Yan I. Liu Wnt signaling: complexity at the surface [J]. Journal of Cell Science, 2006, 119: 395-402
- [4] Fei Liu, Emily Y. Chu, Watt B, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis [J]. Developmental Biology, 2008, 313: 210-224
- [5] Brault V., Moore R., Kutsch S, et al. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. [J]. Development, 2001, 128: 1253-1264
- [6] Lan, Y., Wang, Q., Catherine E. et al. A unique mouse strain expressing Cre recombinase for tissue-specific analysis of gene function in palate and kidney [J]. Developmental Biology, 2007, 157: 618-624
- [7] Suomalainen M., Thesleff I. Patterns of Wnt pathway activity in the mouse incisor indicate absence of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the epithelial stem cells [J]. Developmental Dynamics, 2010, 239(1): 364-372
- [8] Jian quan Chen, Yu Lan, Jin-A Back et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development [J]. Developmental Biology, 2009, 334: 174-185
- [9] Munne, P., Thesleff, I., Jernvall, J. Spitting placodes: effects of BMP and Activin on the patterning and identity of mouse incisors [J]. Developmental Biology, 2010, 348: 383-392
- [10] Sayumi Fujimori, Hermann Novak, Irma Thesleff, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the dental mesenchyme regulates incisor development Developmental Biology by regulating Bmp4. [J]. Developmental Biology, 2010, 348(1): 97-106
- [11] Van Noort M., Clevers, H. TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer [J]. Dev Biol, 2002, 244: 1-8
- [12] Tian H, Lv P, Ma K, Zhou C, et al. Beta-catenin/LEF1 activated enamel expression in ameloblast-like cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(3): 519-524
- [13] Tomoyo Sasaki, Yoshihiro Ito, Chai Y, et al. LEF1 is a critical epithelial survival factor during tooth morphogenesis. [J]. Developmental Biology, 2005, 278: 130-143
- [14] Jiang RZ, Zhu EX, Liu TJ. Expression of beta-catenin and adenomatous polyposis coli protein and correlation between them in the development of mouse tooth germ [J]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2009 (4): 370-373
- [15] Hill T.P., Taketo M.M., Birchmeier W., et al. Multiple roles of mesenchymal beta-catenin during murine limb patterning [J]. Development, 2006, 133: 1219-1229
- [16] Zhou C.J., Molotkov, A., Song, L., Li, Y., et al. Ocular coloboma and dorsoventral neuroretinal patterning defects in Lrp6 mutant eyes [J]. Developmental Dynamics, 2008, 237: 3681-3689
- [17] Shu W, Guttentag S, Wang Z, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling acts upstream of N-myc, BMP4, and FGF signaling to regulate proximal-distal patterning in the lung [J]. Developmental Biology, 2005, 283: 226-239
- [18] Song L., Li Y., Wang K., et al. Lrp6-mediated canonical Wnt signaling is required for lip formation and fusion [J]. Development, 2009, 136: 3161-3171
- [19] Polakis P Wnt signaling and cancer [J]. Genes Development, 2000, 14: 1837-1851
- [20] Xiu-Ping Wang, Daniel J. O'Connell, et al. Apc inhibition of Wnt signaling regulates supernumerary tooth formation during embryogenesis and throughout adulthood [J]. Development, 2009, 136: 1939-1949
- [21] Chen Y, Bei M, Woo L, et al. Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis [J]. Development, 1996, 122: 3035-3044
- [22] 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
- [23] Lammi L, Arte S, Pekka Nieminen, et al. Mutations in Axin2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer [J]. Am J Hum Genet, 2004, 74: 1043-1050
- [24] N Callahan, A Modesto, R Meira, et al. Axis Inhibition Protein 2 (AXIN2) Polymorphisms and Tooth Agenesis. [J]. Arch Oral Biol, 2009, 54(1): 45-49
- [25] 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]. Developmental Dynamics, 2010, 239: 160-167
- [26] Scheller EL, Chang J, Wang CY. Wnt/ $\beta$ -catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation [J]. Dent Research, 2008, 87: 126-130