胚胎小鼠颌下腺分支形态发生及其影响因素

刘志凯 王淳艺 李春洁
口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心
四川大学华西口腔医院头颈肿瘤外科 成都 610041

[摘要] 颌下腺作为重要的唾液腺组成部分，其临床相关实验与器官重构的意义在近年来越发受到重视。本文综述了近年来国内外颌下腺的研究进展，介绍了颌下腺分支形态发生的基本概念，分析了分支形态发生过程中相关的影响因素，包括生长因子、激素、微小RNA等多个方面。

[关键词] 颌下腺； 分支形态发生； 表皮生长因子； 成纤维细胞生长因子； 微小RNA
[中图分类号] R 782 [文献标志码] A [doi] 10.7518/gjkq.2019.01.008

Research progress on submandibular gland branching-morphogenesis and its influencing factors in embryonic mice

Liu Zhikai, Wang Chunyi, Li Chunjie. (State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Dept. of Head and Neck Tumor Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (81500807).

[Abstract] As an important part of salivary glands, submandibular gland's significance of clinical experiments and organ reconstruction is drawing more attention in recent years. In this paper, starting from the research status at abroad, we point out the submandibular gland and its basic concepts of branching morphogenesis. Then we introduce the relevant factors of affecting research in recent years such as the growth factors, hormone and micro RNA, etc..

[Key words] submandibular gland; branching-morphogenesis; epidermal growth factor; fibroblast growth factor; microRNA

颌下腺作为唾液腺重要的组成部分，通过提供唾液来发挥维持口腔内酸碱度、杀灭有害细菌等作用，来维持口腔健康。

目前因唾液腺功能丧失或手术切除唾液腺的患者生活质量会明显降低，因此研究小鼠胚胎过程中颌下腺的分支形态发生（branching-morphogenesis，BrM）及相关影响因素，对更好地构建体外颌下腺模型供临床实验研究、设计构造人工颌下腺等均有重要意义。

本文总结了近年来有关颌下腺BrM过程及其影响因素的研究，为未来更加深入的研究提供方法与思路。

[收稿日期] 2018-04-15；[修回日期] 2018-08-02
[基金项目] 国家自然科学基金（81500807）
[作者简介] 刘志凯，学士，Email：liuzhikai2015@qq.com
[通信作者] 李春洁，副教授，博士，Email：lichunjie@scu.edu.cn

1 颌下腺BrM

BrM是存在于在全身大部分器官发育中一种重要的生长、分化、形成过程，通常见于拥有较为复杂功能的器官，如，肺、肾、乳腺和唾液腺等[1]。在BrM过程中，里层上皮生长成间质，形成胶囊状包裹外层上皮。外层上皮细胞伸长为生长茎，在茎端形成圆形的末端。茎的远端形成裂隙，标志着其将伸长生成2个分支的部位，每个分支部位末端又再次形成新的圆形末端部分，而原来伸长的细长茎部分获得管腔成为管道。颌下腺不断重复上述过程，直到达到适当的器官尺寸[2]。

在颌下腺的相关研究中，胎鼠的颌下腺常作为重要的体外研究模型。胎鼠颌下腺的BrM过程主要包括5个阶段：1）早期胚胎出现口腔部分上皮的增厚过程；2）接着在妊娠12 d时小鼠胚胎唾

液腺腺体的上皮细胞生长芽出现，其逐渐向口底区域生长为浓缩神经嵴源间质；3）在13.5 d时胚胎腺体部分形成早期的裂缝与腺体管腔；4）14 d时胚胎腺体高度分支化，形成早期腺体；5）15 d时腺体组织中出现前腺泡细胞，其细胞产物导致腺体组织和功能进一步分化等。因而，研究者常采用妊娠12.5 d或13 d的胎鼠颌下腺作为体外模型，此方法目前使用最为广泛且建模效果理想。

2 影响胎鼠颌下腺BrM的因素

颌下腺的BrM受多种因素的共同调节，是多种因素共同作用的结果。目前已发现的影响因素包括基因组成分、多种类型的生长因子、激素与组织细胞等。以上这些因素均参与到了颌下腺的BrM过程中，对调节正常的颌下腺发生过程有不可或缺的作用。

2.1 生长因子

生长因子是目前已知的调节颌下腺BrM过程的最重要的因素之一。目前已发现多种生长因子，如表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）、转化生长因子（transforming growth factor，TGF）、成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）等均对颌下腺的BrM过程有重要作用。Koyama等[3]研究了FGF与EGF类生长因子对颌下腺BrM的作用及其作用发生的相关信号通路，发现了FGF7通过活化人磷酯酶（phospholipase，PL）Cγ1通路和激活细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinases，ERK）1/2通路，刺激腺体的裂形成和茎伸长，FGF10则主要通过激活PLCγ1通路来刺激茎伸长，EGF则通过激活ERK1/2通路刺激裂形成。Häärä等[4]使用EGF受体小分子抑制剂，阻断了ERK1/2、PLC和胞内磷脂酰肌醇激酶信号通路，使胎鼠颌下腺间充质细胞凋亡，因此EGF受体在BrM过程中的作用是支持上皮细胞的增殖、成熟与间充质细胞的存活。Kobayashi等[5]在小鼠颌下腺模型中，观察了胶原蛋白凝胶和基本纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）对损伤颌下腺组织再生效果的影响，结果显示：含有bFGF凝胶组的颌下腺再生回复状况较对照组更为良好，由此可见，bFGF有助于唾液腺的再生。

TGF在颌下腺BrM过程中的相关作用研究目前还较少。最近Cortez等[6]的研究发现了TGF-β具有引导颌下腺先天淋巴细胞分化中的作用，其通过敲除细胞中的TGF相关基因之后检测淋巴细胞的分化水平，证明了TGF-β在先天淋巴细胞分化过程中作为信号分子发挥了积极的诱导作用。

Gao等[7]的研究则发现，TGF-β1对颌下腺发育的BrM总体呈现抑制作用，在中和TGF-β1后，BrM的抑制作用则被消除。TGF-β1主要是通过激活Smad3来表现其对BrM的抑制作用的，若将Smad3激活过程阻断，则该抑制作用消失。

而Sathi等[8]的研究则发现，巨噬细胞集落刺激因子（macrophage colony stimulating factor，MCSF）也可刺激颌下腺的BrM和面部神经网络的发生发展，其在实验中通过体外细胞组织培养与免疫与蛋白质印迹分析等方法，证明MCSF作为上游分子通过胞内磷脂酰肌醇激酶通路，促进FGF7、FGF10的表达，达到了促进下颌下腺BrM的结果。

音猬因子（sonic hedgehog，SHH）是刺猬因子家族的一种，其在舌、胰腺、肾等多种器官的形成中发挥着重要作用[9]。Mizukoshi等[10]研究发现，在SHH缺陷的小鼠胚胎中E14时可见不正常的颌下腺发育，故其可能与颌下腺BrM有密切关系；其通过不同浓度SHH处理组织后可见，SHH通过EGF/ErbB信号通路刺激颌下腺的BrM过程，高浓度的SHH可诱导EGF/ErbBH家族配体与受体mRNA合成，也可激活以ERK1/2为例的ErbB信号系统，从而刺激颌下腺BrM。而SHH本身也可直接诱导颌下腺的BrM，达到促进颌下腺增大、分化程度增高的结果。

根据以上的研究可以发现，目前已经发现的主要生长因子对颌下腺的BrM过程都存在着不同且重要的作用。同时不同生长因子之间也可能存在着互相作用，但目前该方面的研究数量较少，可能会成为相关研究更进一步发展的方向。

2.2 激素

褪黑素长久以来被普遍认为是大脑松果体分泌的一种激素，能够改善睡眠、调整时差。然而，最近Obana-Koshino等[11]的研究表明，褪黑素在颌下腺BrM过程中也有其特定的作用，他们在实验中发现褪黑素可在唾液中检测到，同时通过检测褪黑素前体mRNA的水平，证实了褪黑素受体在胚胎期颌下腺腺泡上皮细胞中有高表达；以不同浓度的外源性褪黑素刺激颌下腺后，观察到腺体分支化与芽形成明显减少，证实了外源性褪黑素可抑制颌下腺生长大小和BrM过程。而其作

用机制可能是褪黑素膜受体在胚胎颌下腺BrM过程中有高表达，而褪黑素作为抑制剂或负性调节因子与颌下腺受体结合后，通过调节细胞的凋亡和增殖过程，使增殖细胞增多，凋亡细胞减少，因此腺体中的预留空间转变为细胞联结，从而抑制上皮细胞的聚集和分支过程。该研究的发现使得传统激素类物质对BrM过程的作用开始受到重视，证明了传统激素类物质可通过血液系统对全身发挥作用，故可能还存在更多相关的激素类物质对该过程存在调节作用。

2.3 微小RNA等核酸类物质

近年来，微小RNA（microRNA，miRNA）的作用与相关研究已成为热点，其在颌下腺BrM中的作用也成为研究的方向之一。Jevnaker和Osmundsen[12]测定了小鼠胚胎磨牙胚和颌下腺的RNA表达谱，发现9种特定miRNA与发育过程具有一致性。Gluck等[13]通过RNA测序的方式绘制了小鼠颌下腺生长分化过程中的基因组图谱，二者都证明了miRNA在胎鼠颌下腺的BrM过程中存在着重要作用。

Rebustini等[14]研究发现，miRNA-200c在颌下腺BrM中存在抑制作用，其通过极低密度脂蛋白受体（very low density lipoprotein receptor，Vldlr）调节FGF受体依赖性的上皮增殖；当敲除相关前体基因后，miRNA-200c合成与功能的受损会促进上皮细胞增殖；通过免疫蛋白分析等方法发现，当miRNA-200c的水平下降时，Vldlr合成增加，上皮细胞增殖随之增加。故miRNA-200c对正常的颌下腺BrM过程存在负性调节过程。该研究同时表明，miRNA-200c与Vldlr可能作为上皮修复或再生的新靶点，其与癌症的发生也存在着相关性。

Hayashi等[15]研究了EGF相关的miRNA在颌下腺发育过程中的表达情况，他们通过对比不同浓度EGF处理后的颌下腺组织与对照组，分析出了44种已知的miRNA和4种新发现的miRNA可能与颌下腺BrM过程相关。在后续的实验[16]中，他们重点研究了颌下腺间质细胞中miRNA-21的相关作用，通过检测不同时期miRNA-21的水平，发现其正向变化与EGF水平增高相关；而其负向变化则与腺体上皮组织中分化产生的芽数量减少相关。在经过定量统计分析后，他们发现了2种miRNA-21的靶基因——Reck和Pdcd4，并且这2个靶基因还受到miRNA-21的负向调节。

长链非编码RNA（long non-coding RNA，lncRNA）是一类不编码蛋白质的长链RNA，其具体作用与作用机制近年来开始受到重视。Wong[17]认为，唾液中分泌的非编码RNA可作为分子治疗的新靶点。而在临床方面，Shi等[18]已证明lncRNA的表达与唾液腺原发性干燥综合征相关。因此lncRNA在颌下腺的发育过程中也可能存在特定的作用，可作为非编码RNA层面未来的研究方向。

2.4 颌下腺组织细胞

颌下腺组织细胞中也有部分细胞可以参与调节其BrM过程。Kwon和Larsen[19]的研究发现，在腺体的起始裂隙形成过程中协调祖细胞群对其也存在一定作用。以往研究认为间质在上皮细胞分化中具有指导作用，但最近研究表明上皮细胞在分化的过程中也存在一定的自主性。祖细胞群包括颅神经嵴细胞、施万细胞衍生的副交感神经节（parasympathetic ganglion，PSG）前体和未知来源的内皮细胞前体。上皮细胞对促进间充质FGF10表达具有积极作用，其随后诱导上皮形态发生。但PSG和内皮细胞前体对分化起始过程的可能贡献仍是未知的。在对上皮祖细胞的研究过程中，人们已经发现了3种推定的祖细胞标记：Achaete-Scute家族复合同系物3（achaetescute complex homolog 3，Ascl3）[20]、细胞角蛋白（cytokeratin，CK）5[21]和工具因子KIT[22]。这3种标记可作为祖细胞分化方向的依据之一，如Ascl3$^+$的细胞可分化为腺泡、导管细胞亚群；CK5$^+$细胞可依次分化为CK5$^+$/CK19$^+$细胞、CK19$^+$细胞、CK7$^+$导管细胞，但同时也可分化为其他的上皮细胞类型；KIT$^+$细胞可分化为KIT$^+$CK5$^+$的腺体中央部分细胞和KIT$^+$CK14$^+$的腺体外周部分细胞，同时KIT$^+$CK14$^+$的细胞可在嗜神经因子的作用下，调节分化成为腺体中央部分细胞。

3 建立数学模型分析颌下腺BrM情况

颌下腺的BrM过程较复杂，相关影响因素较多且存在相互影响，需要建立一个合适的模型进行其影响因素的分析。Ray等[23]利用颌下腺BrM过程中细胞的多参数模型进行分析，构建了一种基于时间和空间相关因素的细胞二维模型，其模型模拟了细胞增殖、肌动蛋白的收缩、细胞和细胞基质黏连在分裂过程中的作用，并对这些参数在腺体BrM中的作用进行了测试，最终采用分类分

析的方法确定了4种重要的影响因素，分别是：细胞收缩性、裂区细胞黏附力、上皮细胞丝分裂率和细胞基质黏附力。该研究利用数学公式对细胞分裂进程进行量化分析，以格莱泽格-霍格威格模型的思路，通过前体内颌下腺器官培养、免疫细胞化学和共焦成像以及共焦延时序列采集图像并进行处理分析，最终建立了颌下腺分支形态形成的单裂模型并对相关因素的影响进行了模拟预测。模拟结果显示，中等水平的裂细胞收缩率，低上皮细胞增殖率，细胞-细胞连接的减少，以及裂区细胞基质黏附力的增强，均可以促进颌下腺的发育过程。

数学模型的建立为未来研究颌下腺BrM的影响因素提供了一个新的方法，并证明这一方法是十分有效的。未来数学模型可更广泛地应用于研究多种因子共同作用时的相互作用，及其对整体分化过程的影响的领域中。

4 小结

颌下腺BrM作为颌下腺发育的重要过程，在未来颌下腺的重建与功能恢复过程中占有重要的地位。近年来相关的研究数量逐步增加，但其具体发生机制仍未研究透彻。Ogawa等[24]曾成功实现将基因工程改造后的颌下腺胚原位移植入成年小鼠体内，发现其能继续发育并具有唾液分泌功能。该研究为颌下腺的构建与移植提供了坚实的基础，而研究透彻其生长分化的影响因素便是构建体外颌下腺的第一步。

而Racz等[25]的研究通过基因治疗的手段，将颌下腺作为分泌生长激素的替代器官，改变了小鼠模型中人生长激素的分泌方式。在Racz构建的小鼠模型中，小鼠体内表达的人生长激素随小鼠唾液分泌至口腔，不进入小鼠血液循环，无法发挥生长激素的生理功能。其通过体外、体内2个模型的实验，借助腺病毒等基因编辑工具，改变了小鼠颌下腺基因组及其表达分泌蛋白，使小鼠颌下腺作为一种生长激素分泌替代器官，其分泌的生长激素进入血液循环后可以发挥生长激素正常的生理功能。此研究为未来提供了一种发展方向，即通过体外构建可分泌特殊蛋白的颌下腺并将其植入人体内，以补充某些患者缺少的特殊蛋白。

本文仅就近年来研究发现的主要影响因素加以综述，而影响其BrM的其他相关因素仍将是未来研究的主要方向，各种因素之间的相互作用也可能成为热点问题。只有更加清楚的了解认识BrM过程中的影响因素及其相关作用，才能构建出合适的颌下腺模型，为以后体外构建颌下腺腺体、解决唾液腺功能缺失的问题打下更为坚实的基础。

5 参考文献

[1] Sakai T. Development and regeneration of salivary gland toward for clinical application[J]. Oral Sci Int, 2016, 13(1): 7-14.

[2] Tucker AS. Salivary gland development[J]. Semin Cell Dev Biol, 2007, 18(2): 237-244.

[3] Koyama N, Hayashi T, Kashimata M. Regulation of branching morphogenesis in fetal mouse submandibular gland by signaling pathways activated by growth factors and α6 integrin[J]. J Oral Biosci, 2011, 53(4): 298-303.

[4] Häärä O, Koivisto T, Miettinen PJ. EGF-receptor regulates salivary gland branching morphogenesis by supporting proliferation and maturation of epithelial cells and survival of mesenchymal cells[J]. Differentiation, 2009, 77(3): 298-306.

[5] Kobayashi F, Matsuzaka K, Inoue T. The effect of basic fibroblast growth factor on regeneration in a surgical wound model of rat submandibular glands [J]. Int J Oral Sci, 2016, 8(1): 16-23.

[6] Cortez VS, Cervantes-Barragan L, Robinette ML, et al. Transforming growth factor-β signaling guides the differentiation of innate lymphoid cells in salivary glands[J]. Immunity, 2016, 44(5): 1127-1139.

[7] Gao P, Qiao XH, Gou LM, et al. TGF-β1 attenuated branching morphogenesis of embryonic murine submandibular gland through Smad3 activation[J]. Anat Histol Embryol, 2017, 46(6): 600-605.

[8] Sathi GA, Farahat M, Hara ES, et al. MCSF orchestrates branching morphogenesis in developing submandibular gland tissue[J]. J Cell Sci, 2017, 130(9): 1559-1569.

[9] Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles[J]. Genes Dev, 2001, 15(23): 3059-3087.

[10] Mizukoshi K, Koyama N, Hayashi T, et al. Shh/Ptch and EGF/ErbB cooperatively regulate branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands [J]. Dev Biol, 2016, 412(2): 278-287.

[11] Obana-Koshino A, Ono H, Miura J, et al. Melatonin inhibits embryonic salivary gland branching morphogenesis by regulating both epithelial cell adhesion and morphology[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0119960.

[12] Jevnaker AM, Osmundsen H. MicroRNA expression profiling of the developing murine molar tooth germ and the developing murine submandibular salivary gland[J]. Arch Oral Biol, 2008, 53(7): 629-645.

[13] Gluck C, Min S, Oyelakin A, et al. RNA-seq based transcriptomic map reveals new insights into mouse salivary gland development and maturation[J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 923.

[14] Rebustini IT, Hayashi T, Reynolds AD, et al. miR-200c regulates FGFR-dependent epithelial proliferation via Vldlr during submandibular gland branching morphogenesis[J]. Development, 2012, 139 (1): 191-202.

[15] Hayashi T, Koyama N, Gresik EW, et al. Detection of EGF-dependent microRNAs of the fetal mouse submandibular gland at embryonic day 13[J]. J Med Invest, 2009, 56(Suppl): 250-252.

[16] Hayashi T, Koyama N, Azuma Y, et al. Mesenchymal miR-21 regulates branching morphogenesis in murine submandibular gland *in vitro*[J]. Dev Biol, 2011, 352 (2): 299-307.

[17] Wong DT. Salivary extracellular noncoding RNA: emerging biomarkers for molecular diagnostics[J]. Clin Ther, 2015, 37(3): 540-551.

[18] Shi H, Cao N, Pu Y, et al. Long non-coding RNA expression profile in minor salivary gland of primary Sjögren's syndrome[J]. Arthritis Res Ther, 2016, 18 (1): 109.

[19] Kwon HR, Larsen M. The contribution of specific cell subpopulations to submandibular salivary gland branching morphogenesis[J]. Curr Opin Genet Dev, 2015, 32: 47-54.

[20] Rugel-Stahl A, Elliott ME, Ovitt CE. Ascl3 marks adult progenitor cells of the mouse salivary gland[J]. Stem Cell Res, 2012, 8(3): 379-387.

[21] Nelson DA, Manhardt C, Kamath V, et al. Quantitative single cell analysis of cell population dynamics during submandibular salivary gland development and differentiation[J]. Biol Open, 2013, 2(5): 439-447.

[22] Lombaert IM, Abrams SR, Li L, et al. Combined KIT and FGFR2b signaling regulates epithelial progenitor expansion during organogenesis[J]. Stem Cell Reports, 2013, 1(6): 604-619.

[23] Ray S, Yuan D, Dhulekar N, et al. Cell-based multiparametric model of cleft progression during submandibular salivary gland branching morphogenesis [J]. PLoS Comput Biol, 2013, 9(11): e1003319.

[24] Ogawa M, Oshima M, Imamura A, et al. Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ[J]. Nat Commun, 2013, 4: 2498.

[25] Racz GZ, Zheng C, Goldsmith CM, et al. Toward gene therapy for growth hormone deficiency via salivary gland expression of growth hormone[J]. Oral Dis, 2015, 21(2): 149-155.

（本文编辑 张玉楠）