

· 综述 ·

维生素 A 在胚胎发育中的作用

张志波, 郭俊斌 综述, 王练英 审校

(中国医科大学附属第二医院(盛京医院)小儿外科, 辽宁 沈阳 110005)

[中图分类号] R977.2⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1008-8830(2005)01-0088-04

维生素 A 及其活性代谢产物作为人类一种必需的营养物质, 参与体内的许多生理过程, 包括视力、生殖、生长、细胞分化、免疫功能、以及胚胎发育等。自然存在或合成的具有与维生素 A 类似结构的化合物称为维生素 A 类物。在正常的胚胎发育过程中维持恰当的维生素 A 水平很重要, 在孕期维生素 A 缺乏和过多地应用均可导致胚胎发育异常^[1]。本文就维生素 A、视黄酸等对胚胎发育的影响、基因调控综述如下。

1 维生素 A 类物的概述

维生素 A 通常以酯类或胡萝卜素的形式存在于食物中, 在体内以酯类形式贮存(主要在肝脏)或进一步代谢后发挥其生理功能^[2]。在已知的维生素 A 异构体中, 全反式视黄醇为最常见。事实上, 大多数维生素 A 类物均有可能以多种异构体的形式存在于各种组织中, 作为功能性维生素 A 类物的合成前体或替代物在发挥作用^[3]。目前已经被公认的活性维生素 A 类物包括全反式维甲酸、9-顺维甲酸、11-顺视黄醛、3,4 双脱氢维甲酸等, 4-氧维甲酸、4-氧视黄醇、14-羟-4,14 反视黄醇也是可能的活性形式。

维生素 A 类物的大多数生理功能均由各种核受体如类固醇激素、甲状腺激素、维生素 D 受体以及维生素 A 类物受体超家族介导。对于维生素 A 类物受体的研究则主要包括两类配体依赖性的转录因子, 即 RAR_α 和 RXR_α 及 ROR^[4,5], 每种亚型又包括若干同功型, 彼此之间可能在增强效应上有所区别, 在胚胎的发育中 RAR_α 和 RXR_α 各亚型还存在组织特异性的表达模式^[7]。

通常维生素 A 类物的活性是由 RAR-RXR 杂合子介导, 也有异议, 认为 RXR 纯合子亦具有生物活

性。RAR_α 活性配体包括全反式维甲酸、9-顺维甲酸、4-氧维甲酸、3,4 双脱氢维甲酸、4-氧视黄醇等, RXR_α 活性配体则有 9-顺维甲酸、植烷酸等。

2 维生素 A 类物对胚胎发生的作用

2.1 维生素 A 缺乏对胚胎发生的影响

上世纪 40 年代起, 大量动物实验(大鼠、猪)证明由于维生素 A 缺乏导致的先天畸形并且最终被描述为维生素 A 缺乏综合征。据统计这些畸形种类包括眼部畸形(75%)以及泌尿生殖道(42%)、肾脏(38%)、膈肌(31%)肺脏(4%)、主动脉弓(9%)以及心脏(4%)等的畸形。这些畸形均可以通过饮食控制得以预防, 从而首次提出了是营养因素而非遗传因素导致了这些畸形。

1946 年, 全反式维甲酸(all-trans Retinoic Acid, atRA)的成功合成为系统和准确的研究维生素 A 缺乏与胚胎发生的关系提供了条件, 因为 atRA 半衰期短且在体内不易贮存, 从而可以取代胡萝卜素和维生素 A 成为支持维生素 A 缺乏动物的良好的维生素 A 类物, 并且可以更准确的控制维生素 A 缺乏水平。White 等^[8]利用 atRA 支持的维生素 A 缺乏的孕鼠模型研究发现在胚胎期存在着一个严格的发育窗口期(妊娠 8.5 ~ 10.5 d), 这时胚胎对维生素 A 的需求是增加的, 若不能满足则会出现中枢神经系统和心血管系统的畸形甚而造成死胎。并表明 atRA 是这段时间维生素 A 的活性形式^[9]。

2.2 全反式维甲酸生物合成对胚胎发生的影响

通过影响 atRA 生物合成的关键酶的表达可以干扰发育中胚胎的视黄酸信号。目前最为明显的具有大多数表型的就是 RALDH2 基因突变^[10], 这些胚胎除了发育中的眼睛外其他组织并没有表现出视黄酸感应的转基因改变, 说明了这些酶类在 atRA 早期

[收稿日期] 2003-12-08; [修回日期] 2004-04-10

[作者简介] 张志波(1971-), 女, 博士, 讲师。主攻方向: 先天性消化道畸形的基础与临床研究。

合成中的作用。RALDH2 基因突变的胚胎均在怀孕后 12.5 d 之前死亡,而且纯合子表现出严重的发育缺陷包括轴向旋转异常、心脏形态异常、神经管闭合不良、躯干变短、肢芽缺如等,这些胚胎的后脑区域也出现了严重形态学异常,表现为第 3、4 菱脑原节向尾侧延伸和第 5~8 菱脑原节的下调或缺如^[11]。这些胚胎发育的异常可以通过投以大剂量 atRA (100~200 $\mu\text{g/g}$) 予以防止,其用量与维生素 A 缺乏大鼠模型用量(250 $\mu\text{g/g}$)相似。

2.3 视黄酸及受体拮抗剂应用对胚胎发生的影响

视黄酸是哺乳动物胚胎发育及脑发育重要的形态发生素和营养因子,视黄酸通过细胞核受体调控因子表达,可提高多种神经元群 mRNA 水平,促进神经分化并参与中枢神经系统损伤修复。使用视黄酸受体拮抗剂,利用其与受体的自然亲和力,通过竞争性抑制干扰 RAR 介导的视黄酸信号也能影响胚胎发育。全 RAR 拮抗剂分子已经被广泛的应用于细胞和组织培养中,许多实验室已经培养出了在全 RAR 拮抗剂存在下的鼠胚,这样就提供了一种有效的方法,可以人为决定在特定的过程和时机提供 atRA 信号。Kochhar^[12]对处于不同孕期的小鼠投以全 RAR 拮抗剂,发现从孕 7~11 d 施以常用量口服(1 mg/kg)可以产生颅面部畸形和小眼或眼睛缺如,在孕 14 d 时对孕鼠投以 100 mg 的拮抗剂则产生了皮肤上皮的改变,这种改变与 RARs 表达阴性时的表型类似但畸形较之为轻。这样利用对孕鼠或培养鼠胚施以拮抗剂或许可以为详细分析维生素 A 信号对于正常发育的作用提供一种思路。

2.4 受体基因突变模型与胚胎发生的关系

为说明维生素 A 类物对于胚胎发育和出生后发育的作用,建立 RAR 和 RXR 同功型和各亚型的小鼠基因突变模型无疑是一种更具有说服力的方法。早期的研究表明^[13~15] $\text{RAR}\alpha_1^{-/-}$, $\text{RAR}\beta_2^{-/-}$ 以及 $\text{RAR}\gamma_2^{-/-}$ 的小鼠并没有表现出明显的先天和出生后的缺陷,将所有 $\text{RAR}\beta$ 基因敲除的鼠产出了基本上正常的后代,仅发现了一种颅神经节(第 9 和 10 神经节融合)发育异常,而且外显率很低。在孕 10.5 d 时仅为 1/11。然而当 $\text{RAR}\alpha$ ^[16] 或者 $\text{RAR}\gamma$ ^[17] 的所有的同功型均突变时,其后代表现出广泛的出生后致死性,其纯合子中仅有不到 10% 可以存活至 3 月。大约 60% 的 $\text{RAR}\alpha^{-/-}$ 突变小鼠在前肢和后肢均表现出蹼状指畸形, $\text{RAR}\gamma^{-/-}$ 突变小鼠也表现出了几种先天畸形,包括气管软骨发育不良、颈椎的同源转换。几乎所有上世纪 40 及 50 年代提到的与维生素 A 缺乏相关的异常均可在复合

突变的小鼠中($\text{RAR}\alpha_1^{-/-}/\beta_2^{-/-}$ 、 $\text{RAR}\alpha^{-/-}/\beta_2^{-/-}$ 、 $\text{RAR}\alpha_1^{-/-}/\gamma_2^{-/-}$ 、 $\text{RAR}\alpha_1^{-/-}/\gamma^{-/-}/\alpha_2^{-/-}$ 、 $\text{RAR}\alpha^{-/-}/\gamma^{-/-}$ 、 $\text{RAR}\beta_2^{-/-}/\gamma^{-/-}$ ^[17]、 $\text{RAR}\alpha_1^{-/-}/\text{RAR}\beta^{-/-}$ ^[18]、 $\text{RAR}\beta_2^{-/-}/\text{RAR}\gamma_2^{-/-}$ ^[19])观察到,在 RAR 复合突变的小鼠中还发现了不少以往并未提及的包括眼部及唾液腺和其管道、前肢和后肢的骨骼系、颈部区域的中轴骨等的畸形。最近的工作也支持在胚胎发育中中轴和前肢骨骼畸形应属于维生素 A 缺乏综合征的表型范畴。

从基因突变小鼠和维生素 A 缺乏模型中获得的资料有许多的相通之处。如 Dupe 等^[20]发现在 $\text{RAR}\alpha$ 和 $\text{RAR}\beta$ 的复合基因突变小鼠中表现出了后脑后侧区域的发育异常, $\text{RAR}\alpha^{-/-}/\text{RAR}\gamma^{-/-}$ 复合突变小鼠在早期后脑模式形成上表现出了更严重的异常,这些在 RALDH2 突变小鼠和 atRA 不足的大鼠胚胎中均有体现。

对于 RXRs 在介导维生素 A 类物的发育信号过程中的作用,已经有许多研究通过 RXRs 突变和 RAR/RXR 复合突变小鼠的途径得到检验。RXR β , RXR γ 突变小鼠是可以存活的^[21,22],但 RXR α 对于胚胎存活却是必需的^[23]。RAR 同功型联结 RXR α 的复合基因突变产生了许多在 RAR 双重突变中见到的表型^[24],提示可能 RXR/RAR 杂合子在体内发生了视黄酸信号的换能。另外有关 RXR 突变小鼠的研究还发现 RXR/RAR 杂合子在红细胞生成素的表达中也有短暂的调节作用^[25]。

3 维生素 A 类物的致畸性

维生素 A 类物质不足与过量具有致畸性已经得到认可^[26]。由 atRA 诱导产生的畸形具有孕期阶段特异性。目前已经利用 RA 诱导出了神经管畸形、马蹄足^[27]以及肛门直肠畸形^[28]等。

过多的维生素 A 可能通过过度激活正常部位的维甲酸受体或者激活异位的维甲酸受体来干扰视黄酸信号系统从而产生畸形,也可能通过作用于其他基因表达调控因子而影响靶基因的表达而产生畸形。例如 Bitoh 等^[29]通过对 atRA 诱导的小鼠肛门直肠畸形胚胎进行研究,发现 $\text{RAR}\alpha$ 在后肠及尾沟区表达异常,提示 atRA 是通过破坏视黄酸信号系统进而影响远侧的肠道发育的。另外 Mao 和 Collins^[30]则对伴或不伴脊柱裂的鼠胚中 $\text{RAR}\beta$ 和 $\text{RAR}\gamma$ 进行研究发现这两种受体表达位置不随畸形有无改变,在 RA 作用下只是前侧区域表达强度增加而后侧区

域强度降低。

通过小鼠胚胎肢芽间充质细胞的体外组织培养以及对孕期特定时期全胚胎致畸性研究对一系列的具有受体特异性的维生素 A 物筛查发现^[31],RARs 的配体是潜在的致畸剂,对 RARs 各亚型的特异性配体的相对致畸潜能和受累组织特异性进行筛查发现^[32],致畸潜在危害大小依次为 RAR α 配体 > RAR β 配体 > RAR γ 配体。另外 RAR α 配体主要诱导耳、下颌以及肢体畸形,RAR β 配体则引起泌尿系统及肝脏畸形,而 RAR γ 配体会产生胸骨和椎骨的缺陷。而 RXRs 的配体不具有致畸性,但那些可以同时激活 RARs 和 RXRs 的配体的致畸性居于前两者之间,不能作为配体的物质则没有致畸性。尽管 RXRs 的配体不具有致畸性,但他们可能增强 RAR 配体的致畸性,产生脊柱裂、肛门闭锁、尾畸形等。多种小剂量致畸原同时存在、共同作用时可抑制胚胎修复能力,发生协同作用,导致胚胎畸形。

4 维生素 A 类物对 Hox 基因的作用

Hox 基因是与胚胎正常发育密切相关的基因,这些基因在表达占有高度的时空特性^[33]。维生素 A 可通过调控 Hox 基因表达影响胚胎发育。在 Hoxa1、Hoxb1、Hoxd4 基因中均发现了维甲酸反应元件,也充分说明了这点。国内孙秀发等^[34]也发现维生素 A 水平与 Hoxc4 表达之间存在正相关。Hox 基因错误表达导致 RA 畸形形成的实验提示维生素 A 类物可能通过调节 Hox 基因的表达来影响发育过程。例如在正常情况下,Hoxa1 表达的最前界位于第四菱脑原节^[35],而在第二、三菱脑原节过度表达 Hoxa1 则使之发生了向第四菱脑原节的转化。另一方面,在 Hoxa1 基因的突变模型中发生了后脑节段的减少即第四、五菱脑原节的缺如。在神经上皮中 Hoxb1 基因的表达继发于 Hoxa1 基因的过度表达,说明在 Hox 基因间存在着相互的作用。这种维生素 A 类物诱导畸形及 Hox 基因突变模型在表型上的相似性提示内源性的维生素 A 类物可能建立了一个由前到后的 Hox 基因表达梯度从而影响着中轴结构从前到后的确定。

5 展望

毫无疑问,维生素 A 在生殖及胚胎发育过程中起着非常重要的作用,目前主要的工作依然是如何将 atRA 介导的基因表达改变与胚胎发育过程中依

赖于维生素 A 信号系统的不同表型变化联系在一起并加以解释。

以往对于维生素 A 类物的研究多数注意到了其对于神经系统发育及畸形形成的作用,对于肠道系统的发育尤其是后肠发育分化的作用却极少提及。对孕鼠投以多量的外源性维生素 A 物常可产生为数不少的肛门直肠畸形,说明其可能干预了后肠的正常发育,那么究竟这一信号系统是如何来参与后肠发育分化过程的呢?张志波等^[36]经过研究发现 Hoxa13 基因可能是先天性肛门直肠畸形的易感基因之一,这些或许也可以为这一畸形的形成机制提供一条思路。

另外通过对 RA、RAR 以及特定的 Hox 基因活性之间这一直接的分子链在胚胎形成过程中的观察,在 Hoxa1、Hoxb1、Hoxd4 基因中均发现了维甲酸反应元件,这说明维生素 A 类物可能起早期发育信号的作用,并且对原肠胚期中轴的前后特异性的形成中起重要作用。但是位于更偏向 5' 端的 Hox 基因是如何受到 RA 调节的却仍未明了。无论如何,Hox 基因调节至少部分是通过原位的维生素 A 提供的信息介导的,过多 RA 产生的在轴向模式形成中的效应也部分是通过破坏在后脑和脊索的 Hox 基因表达介导的。所以说,RA 和它的核受体家族在发育过程中有着重要的作用,这或许可以部分解释尾侧畸形的形成机制。

[参 考 文 献]

- [1] Teelmann K. Retinoids: toxicology and teratogenicity to date [J]. *Pharmacol Ther*, 1989, 40(1): 29-43.
- [2] Blomhoff R, Green MH, Norum KR. Vitamin A: physiological and biochemical processing [J]. *Annu Res Nutr*, 1992, 12: 37-57.
- [3] Chen Y, Derguini F, Buck J. Vitamin A in serum is a survival factor for fibroblasts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(19): 10205-10208.
- [4] Chambon P. A decade of molecular biology of retinoid acid receptors [J]. *FASEB J*, 1996, 10(9): 940-954.
- [5] Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. The retinoid receptors [A]. In Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. *The Retinoids: Biology, chemistry, and Medicine* [M]. 2nd ed. New York, NY: Raven Press, 1994, 319-340.
- [6] Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade [J]. *Cell*, 1995, 83(6): 835-839.
- [7] Dolle P, Fraulob V, Kastner P, Chambon P. Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes [J]. *Mech Dev*, 1994, 45(2): 91-104.
- [8] White JC, Shankar VN, Highland M, Epstein ML, DeLuca HF, Clagett-Dame M. Defects in embryonic hindbrain development and fetal resorption resulting from vitamin A deficiency in the rat are prevented by feeding pharmacological level of all-trans-retinoic acid [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13459-

- 13464.
- [9] White JC, Highland M, Clagett-Dame M. Abnormal development of the sinuatrial venous valve and posterior hindbrain may contribute to late fetal resorption of vitamin A-deficient rat embryos [J]. *Teratology*, 2000, 62(6): 374-384.
- [10] Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development [J]. *Nat Genet*, 1999, 21(4): 444-448.
- [11] Niederreither K, Vermot J, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P. Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo [J]. *Development*, 2000, 127(1): 75-85.
- [12] Kochhar DM, Jiang H, Penner JD, Johnson AT, Chandraratna RA. The use of retinoid receptor antagonist in a new model to study vitamin A-dependent developmental events [J]. *Int J Dev Biol*, 1998, 42(4): 601-608.
- [13] Li E, Sucov HM, Lee KF, Evans RM, Jaenisch R. Normal development and growth of mice carrying a targeted disruption of the $\alpha 1$ retinoic acid receptor gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(4): 1590-1594.
- [14] Mendelsohn C, Mark M, Dolle P, Dierich A, Gaub MP, Krust A, et al. Retinoic acid receptor $\beta 2$ (RAR $\beta 2$) null mutant mice appear normal [J]. *Dev Biol*, 1994, 166(1): 246-258.
- [15] Lohnes D, Kastner P, Dierich A, Mark M, LeMeur M, Chambon P. Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse [J]. *Cell*, 1993, 73(4): 643-658.
- [16] Lufkin T, Lohnes D, Mark M, Dierich A, Gorry P, Gaub MP, et al. High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor α mutant mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(15): 7225-7229.
- [17] Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Decimo D, LeMeur M, et al. Developmental roles of the retinoic acid receptors [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995, 53(1-6): 475-486.
- [18] Luo J, Sucov HM, Bader JA, Evans RM, Giguere V. Compound mutants for retinoic acid receptor (RAR) β and RAR $\alpha 1$ reveal developmental functions for multiple RAR β isoforms [J]. *Mech Dev*, 1996, 55(1): 33-44.
- [19] Grondona JM, Kastner P, Gansmuller A, Decimo D, Chambon P, Mark M. Retinal dysplasia and degeneration in RAR $\beta 2$ /RAR $\gamma 2$ compound mutant mice [J]. *Development*, 1996, 122(7): 2173-2188.
- [20] Dupe V, Ghyselinck NB, Wendling O, Chambon P, Mark M. Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse [J]. *Development*, 1999, 126(22): 5051-5059.
- [21] Kastner P, Mark M, Leid M, Gansmuller A, Chin W, Grondona JM, et al. Abnormal spermatogenesis in RXR β mutant mice [J]. *Genes Dev*, 1996, 10(1): 80-92.
- [22] Krezel W, Dupe V, Mark M, Dierich A, Kastner P, Chambon P. RXR gamma null mice are apparently normal and compound RAR $\alpha^{+/-}$ /RXR $\beta^{-/-}$ /RXR $\gamma^{-/-}$ mutant mice are viable [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(17): 9010-9014.
- [23] Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR α mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis [J]. *Genes Dev*, 1994, 8(9): 1007-1018.
- [24] Kastner P, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, et al. Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis [J]. *Cell*, 1994, 78(6): 987-1003.
- [25] Makita T, Hernandez-Hoyos G, Chen TH, Wu H, Rothenburg EV, Sucov HM. A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4 [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(7): 889-901.
- [26] Collins MD, Mao GE. Teratology of retinoids [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999, 39: 399-430.
- [27] 杜世新, 吉士俊, 马瑞雪. 类先天性马蹄内翻足动物模型的建立及病理演变研究 [J]. *中华小儿外科杂志*, 2003, 24(2): 158-160.
- [28] Bitoh Y, Shimotake T, Sasaki Y, Iwai N. Development of the pelvic floor muscles of murine embryos with anorectal malformations [J]. *J Pediatr Surg*, 2002, 37(2): 224-227.
- [29] Bitoh Y, Shimotake T, Kubota Y, Kimura O, Iwai N. Impaired distribution of retinoic acid receptors in the hindgut-tailgut region of murine embryos with anorectal malformations [J]. *J Pediatr Surg*, 2001, 36(2): 377-380.
- [30] Mao GE, Collins MO. Quantification and localization of expression of the receptor- β and γ mRNA isoforms during neurulation in mouse embryos with or without spina bifida [J]. *Teratology*, 2002, 66(6): 331-343.
- [31] Kochhar DM, Jiang H, Penner JD, Beard RL, Chandraratna AS. Differential teratogenic response of mouse embryos to receptor selective analogs of retinoic acid [J]. *Chem Biol Interact*, 1996, 100(1): 1-12.
- [32] Elmazar MM, Reichert U, Shroot B, Nau H. Pattern of retinoid-induced teratogenic effects: possible relationship with relative selectivity for nuclear retinoid receptors RAR alpha, RAR beta, RAR gamma [J]. *Teratology*, 1996, 53(3): 158-167.
- [33] McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning [J]. *Cell*, 1992, 68(2): 283-302.
- [34] 孙秀发, 朱清华, 刘恭平, 杨丽琛. 维生素 A 和锌营养水平与小鼠胚胎 Hox 基因表达的相关性 [J]. *中华预防医学杂志*, 2001, 35(6): 378-380.
- [35] Zhang M, Kim HJ, Marshall H, Gendron-Maguire M, Lucas DA, Baron A, et al. Ectopic Hoxa-1 induces rhombomere transformation in mouse hindbrain [J]. *Development*, 1994, 120(9): 2431-2442.
- [36] 张志波, 王练英, 李正, 高红. 先天性无肛畸形 Hoxa13 基因的改变 [J]. *中华小儿外科杂志*, 2001, 22(5): 269-270.
- (本文编辑: 吉耕中)