

## 牙颌面畸形专题

## 成骨细胞条件性视黄酸信号失活小鼠模型的构建与验证

孙思远<sup>1,2\*</sup>, 刘媛琪<sup>1,2\*</sup>, 崔怡雯<sup>1,2</sup>, 黄紫晗<sup>1,2</sup>, 梅 李<sup>2,3</sup>, 代庆刚<sup>4</sup>, 江凌勇<sup>1,2</sup>

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面科, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011; 2. 上海-新西兰口腔医学联合实验室/口腔颌面基础与临床研究中心, 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011; 3. 新西兰奥塔哥大学牙学院正颌科, 达尼丁 9016; 4. 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔第二门诊部, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011

**【摘要】目的**·构建并验证可模拟维生素A缺乏症 (vitamin A deficiency, VAD) 导致的颌颌面骨畸形且出生后可存活的小型小鼠。**方法**·运用Cre-LoxP重组酶系统, 通过将  $Osx^{Cre}$  与  $Rosa26^{dnRAR\alpha/dnRAR\alpha}$  基因型的小鼠多代杂交, 构建成骨细胞视黄酸受体 $\alpha$ 显性负突变体 (dominant-negative retinoid acid receptor  $\alpha$  mutation,  $dnRAR\alpha$ ) 条件性过表达小鼠  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$ , 实现成骨细胞视黄酸信号条件性失活以模拟VAD状态。取  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠及其同窝对照小鼠股骨骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cell, BMSC) 与颅顶骨细胞, 成骨诱导后, 采用蛋白质印迹法 (Western blotting) 验证成骨细胞中视黄酸受体 $\alpha$  (retinoid acid receptor  $\alpha$ ,  $RAR\alpha$ ) 蛋白的表达水平。取  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠及其同窝对照小鼠颅顶骨细胞经诱导形成的成骨细胞, 采用双荧光素酶报告基因技术验证视黄酸信号通路抑制程度。同时分别应用表达Cre、eGFP的腺病毒 (Ad-eGFP与Ad-Cre) 感染  $Rosa26^{dn/dn}$  小鼠股骨BMSC与颅顶骨细胞, 成骨诱导后运用相同方法评价显性负突变蛋白表达水平与视黄酸信号通路抑制程度。取6周龄小鼠颅骨, 运用Micro-CT及三维重建技术验证  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  模型小鼠颌颌面骨畸形表型。**结果**·Western blotting结果显示,  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠股骨及颅顶骨成骨细胞相较同窝对照小鼠表现出  $RAR\alpha$  蛋白水平上调。双荧光素酶报告基因实验结果显示  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠成骨细胞的视黄酸反应元件 (retinoid acid response element, RARE) 活性相较同窝对照小鼠下调 ( $P<0.05$ )。同时, Ad-Cre感染后  $Rosa26^{dn/dn}$  小鼠股骨及颅顶骨成骨细胞相较Ad-eGFP感染后表现出  $RAR\alpha$  蛋白水平上调, 成骨细胞的RARE活性下调 ( $P<0.05$ )。Micro-CT及三维重建结果显示, 6周龄  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠颅骨呈现长度缩短、骨发育不全等VAD样颌颌面骨畸形。**结论**·成功构建了成骨细胞条件性视黄酸信号失活小鼠模拟VAD所致颌颌面骨畸形, 为未来VAD所致颌颌面骨畸形出生后致病机制与潜在靶点的研究提供了新的模型与途径。

**【关键词】** 维生素A缺乏症; 颌颌面骨畸形; 成骨细胞; 显性负突变基因条件性表达小鼠; 视黄酸受体

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.06.002 **【中图分类号】** R78 **【文献标志码】** A

## Generation and validation of the conditional osteoblast-specific retinoic acid signaling inhibition mouse model

SUN Siyuan<sup>1,2\*</sup>, LIU Yuanqi<sup>1,2\*</sup>, CUI Yiwen<sup>1,2</sup>, HUANG Zihan<sup>1,2</sup>, MEI Li<sup>2,3</sup>, DAI Qinggang<sup>4</sup>, JIANG Lingyong<sup>1,2</sup>

1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral

**【基金项目】** 上海交通大学医学院“双百人”项目 (20221809); 中央高校基本科研业务费专项资金 (YG2023ZD14); 国家自然科学基金 (82071083, 82271006); 上海市自然科学基金 (21ZR1436900, 22ZR1436700); 海南省自然科学基金 (824MS152); 上海市科技创新行动计划国际科技合作项目/政府间国际科技合作项目 (23410713600); 上海交通大学医学院附属第九人民医院交叉研究基金 (JYJC202116); 上海交通大学医学院生物材料与再生医学交叉研究项目 (2022LHB02); 上海交通大学医学院附属第九人民医院原创项目 (JYYC003)。

**【作者简介】** 孙思远 (1998—), 男, 硕士生; 电子信箱: ssy1412832053@163.com。刘媛琪 (1996—), 女, 回族, 硕士生; 电子信箱: liuyuanqi@sjtu.edu.cn。\*为共同第一作者。

**【通信作者】** 江凌勇, 电子信箱: jianglingyong@sjtu.edu.cn。

**【Funding Information】** “Two-Hundred Talents” Program of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (20221809); Fundamental Research Funds for the Central Universities (YG2023ZD14); National Natural Science Foundation of China (82071083, 82271006); Natural Science Foundation of Shanghai (21ZR1436900, 22ZR1436700); Hainan Provincial Natural Science Foundation (824MS152); Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan-International Science and Technology Cooperation Program (23410713600); Cross-Disciplinary Research Fund of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (JYJC202116); Biomaterials and Regenerative Medicine Institute Cooperative Research Project, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (2022LHB02); Original Exploration Project of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (JYYC003)。

**【Corresponding Author】** JIANG Lingyong, E-mail: jianglingyong@sjtu.edu.cn.

Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology; Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China; 2. Shanghai-New Zealand Joint Laboratory of Dentistry, Centre for Clinical and Fundamental Craniofacial Research, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 3. Department of Oral Sciences, Faculty of Dentistry, University of Otago, Dunedin 9016, New Zealand; 4. Department of 2nd Dental Centre, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology; Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China

**[Abstract] Objective** To construct and verify the mouse model that can mimic the vitamin A deficiency (VAD)-like craniofacial skeletal deformity and do not cause embryonic death. **Methods** Based on the Cre-LoxP system, the *Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice expressing osteoblast-specific dominant-negative retinoic acid receptor  $\alpha$  (*dnRAR $\alpha$* ) mutation were obtained by hybridization through *Osx<sup>Cre</sup>* and *Rosa26<sup>dnRAR $\alpha$ /dnRAR $\alpha$</sup>*  mice, to achieve the conditional inhibition of retinoic acid signaling to simulate VAD disease. Femur bone mesenchymal stem cells (BMSCs) and parietal bone cells of *Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice and their control littermates were isolated and underwent osteogenic induction, to assess the expression of retinoic acid receptor  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) protein through Western blotting. Osteoblasts induced from parietal bone cells of *Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice and their control littermates were isolated and the effect of retinoic acid signaling inhibition was verified through dual luciferase gene reporter assay. Meanwhile, Ad-eGFP or Ad-Cre adenovirus-infected femur BMSCs and parietal bone cells of *Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice underwent osteogenic induction to assess the expression of dominant-negative mutant protein and the inhibition of the retinoic acid signaling pathway *in vitro* by Western blotting and dual luciferase gene reporter assay. Moreover, the skulls of 6-week-old *Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice were collected, and Micro-CT scanning and three-dimensional (3D) reconstruction were performed to verify the craniofacial skeletal deformities of the mouse model. **Results** Western blotting results demonstrated that the level of RAR $\alpha$  protein increased in the femur and parietal osteoblasts of *Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice compared to that of their control littermates, and also increased in the Ad-Cre-infected femur and parietal osteoblasts of *Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice compared to that in the Ad-eGFP-infected group ( $P < 0.05$ ). Dual luciferase gene reporter assay results indicated that the activity of retinoic acid response element (RARE) was inhibited in the osteoblasts of *Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice compared to their control littermates, and was also inhibited in the Ad-Cre-infected group compared to the Ad-eGFP-infected group ( $P < 0.05$ ). Micro-CT and 3D reconstruction suggested that the skull of 6-week-old *Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice exhibited VAD-like craniofacial skeletal deformities, including smaller size of the skull and osteogenesis imperfecta compared to their control littermates. **Conclusion** An osteoblast-specific *dnRAR $\alpha$*  expressing mouse model that can mimic VAD-like craniofacial skeletal deformity is successfully constructed, therefore providing a new model for exploring the pathogenesis and therapeutic targets of VAD-like craniofacial skeletal deformity in the future.

**[Key words]** vitamin A deficiency (VAD); craniofacial skeletal deformity; osteoblast; conditional dominant-negative mutant expressing mice; retinoic acid receptor (RAR)

维生素A及其代谢产物视黄酸是保障生长发育、维持代谢稳态的重要营养物质<sup>[1]</sup>。维生素A缺乏症(vitamin A deficiency, VAD)是由母体孕期维生素A摄入不足等病因导致的全身多系统综合征,其发病率在部分发展中国家较高<sup>[2]</sup>。直至2019年世界部分发展中国家仍有1/3的新生儿罹患VAD,引起广泛关注<sup>[3]</sup>。VAD患者常以眼病与皮肤病变为主<sup>[4]</sup>,好发颅颌面畸形与骨骼畸形<sup>[5]</sup>,可能伴发呼吸系统、胃肠道系统、泌尿系统等多系统反复感染<sup>[6]</sup>。其中,VAD所致眼病最为常见。自1994年研究者运用视黄酸受体 $\alpha$ (retinoid acid receptor  $\alpha$ , RAR $\alpha$ )全敲除(*RAR $\alpha$ <sup>-/-</sup>*)小鼠模型发现病因后<sup>[7]</sup>,2018年报道了出生后补充维生素A可以部分防治VAD所致眼病<sup>[4]</sup>。然而,VAD所致颅颌面骨畸形在出生后无法通过补充维生素A缓解<sup>[4]</sup>,且至今病因尚不明确,也缺乏可研究的疾病动物模型。其原因之一可能是视黄酸受体(retinoid acid receptor, RAR)家族补偿效应,*RAR $\alpha$ <sup>-/-</sup>*小鼠未表现出颅颌面骨畸形故而无法研究<sup>[7]</sup>,

而其他模型诸如*RAR $\alpha$ <sup>-/-</sup>; RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>*小鼠、视黄酸脱氢酶10(retinol dehydrogenase 10, *Rdh10*)全敲除(*Rdh10<sup>-/-</sup>*)小鼠等会发生胚胎死亡,无法研究相关机制及进行出生后干预<sup>[8]</sup>。因此,亟需开发可规避RAR家族补偿效应、出生后可存活且可模拟VAD所致颅颌面骨畸形的新型动物模型。

视黄酸通过视黄酸信号通路介导下游关键因子转录是其调控发育与代谢过程的关键环节,该过程在视黄酸转运入核后,通过与特异性核受体超家族成员结合、激活视黄酸反应元件(retinoid acid response element, RARE)实现<sup>[6]</sup>。该核受体超家族包括RAR和视黄酸X受体(retinoid X receptor, RXR)两大类,每类分别存在3种亚型,即RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$ ,以及RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ 。这些亚型由不同的基因编码,而每种亚型受体又至少包含2种异构体(isoform),同一亚型受体的不同异构体来源于一个基因的不同剪接变体。这些异构体具备一段较为保守的结构域,包括配体结合结构域(ligand binding

domain, LBD)、二聚体结合域及配体依赖的转录激活功能区2(activation function 2, AF2)。视黄酸入核后,与该保守结构域结合,RAR/RXR异源二聚体形成,激活特异顺式作用元件——RARE,并调控下游靶基因转录,进而对生长发育过程发挥调控作用。这些超家族成员有多种组合可形成异源二聚体发挥转录调控功能,是发生补偿效应的重要原因<sup>[9]</sup>。RAR $\alpha$  403是一种仅去除了AF2结构域的RAR $\alpha$ 显性负突变体(dominant-negative RAR $\alpha$ , dnRAR $\alpha$ ),可以与视黄酸结合,也可以与RXR结合,并可结合至DNA,但不具备转录调控功能<sup>[10]</sup>。体外实验<sup>[10]</sup>证实,dnRAR $\alpha$ 可呈剂量依赖性失活RARE转录活性,呈现显性负突变特征,可有效解决RAR家族补偿效应的瓶颈。

近年来,基于Cre-LoxP重组酶系统开发的条件性基因编辑小鼠以具备组织特异性、胚胎死亡率低的优势,迅速取代了全基因敲除小鼠<sup>[11]</sup>。Rosa26位点[Gt(ROSA)26Sor, Rosa26]是一个位于小鼠6号染色体上由3个外显子构成的非编码基因,极易进行基因插入操作,未发现功能性表达蛋白;插入该区域的蛋白可以很好地进行表达,被称为基因组中的“安全位点”(safe harbour)<sup>[12]</sup>。Cre-LoxP重组酶系统与Rosa26位点的开发为条件性基因过表达小鼠的构建提供了基础。因此,本研究基于Cre-LoxP重组酶系统基因编辑原理,构建成骨细胞条件性dnRAR $\alpha$ 过表达小鼠,实现特异性地在成骨细胞及其下游谱系中抑制视黄酸信号通路,模拟VAD的功能异常;并验证dnRAR $\alpha$ 过表达效率及视黄酸信号通路抑制效果,分析过表达后RAR $\alpha$ 蛋白水平与RARE活性。同时,评价小鼠是否出现颅颌面骨畸形表型,为未来VAD所致颅颌面骨畸形出生后致病机制与潜在靶点的研究提供新的模型与途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

Osx<sup>Cre</sup>小鼠(No.006361)购买自美国Jackson实验室,Rosa26<sup>LSL-dnRAR $\alpha$ /LSL-dnRAR $\alpha$</sup> (以下简称Rosa26<sup>dn/dn</sup>)小鼠由美国哥伦比亚大学Cathy MENDELSON教授赠予<sup>[13]</sup>。于江苏集萃药康生物科技股份有限公司将Osx<sup>Cre</sup>小鼠与Rosa26<sup>dn/dn</sup>小鼠杂交2代,子代用于实验。实验使用2周龄雄性小鼠10只、6周龄雄性小鼠

10只,基因型均为Osx<sup>Cre</sup>与Osx<sup>Cre</sup>;Rosa26<sup>dn/dn</sup>各半。饲养于上海交通大学医学院附属第九人民医院无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级动物房,饲养温度(24 $\pm$ 2)°C,12 h昼夜更替,自由饮食。实验小鼠生产许可证号SCXK(苏)2023-0009,使用许可证号SYXK(沪)2020-0025。

### 1.2 主要试剂与仪器

$\alpha$ -MEM培养基(Hyclone,美国),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素/链霉素双抗溶液、胰蛋白酶(Gibco,美国),I型胶原酶(Sigma-Aldrich,美国),II型组织分散酶(Dispase酶)(Roche,瑞士),成骨诱导液(Cyagen,美国),鼠尾基因鉴定试剂盒(上海圣尔生物科技有限公司),聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) mix(北京天恩泽基因科技有限公司),琼脂糖(Biowest,法国),DNA marker(TaKaRa,日本),核酸染料(Genview,美国),10 $\times$ TBST洗液、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG(H+L)(A0208)、Renilla荧光素酶、Lipo8000(上海碧云天生物技术有限公司),5 $\times$ 报告基因专用裂解液、报告基因荧光缓冲液、报告基因终止缓冲液(Promega,美国),细胞刮(Corning,美国),表达Cre的腺病毒(Ad-Cre)、表达eGFP的腺病毒(Ad-eGFP)(汉恒生物科技有限公司),RAR $\alpha$ 一抗(货号62294S, CST,美国)、GAPDH一抗(货号A19056, Abclonal,中国),PVDF膜(GE Health,美国),ECL显影液(Thermo Fisher,美国),对照质粒PGL3-basic、表达双荧光素酶的RARE-Luc质粒[生工生物工程(上海)股份有限公司],核酸电泳缓冲液(Tris-acetate-EDTA buffer, TAE)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(北京索莱宝科技有限公司)。PCR仪(Thermo Fisher,美国),生物分子成像仪(天能科技有限公司),PE EnSpire<sup>TM</sup> Alpha多标记微孔板检测系统(PE,美国),Micro-CT扫描仪(Quantum GX Instrument,日本)。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 小鼠配繁与基因型鉴定** 运用Osx<sup>Cre</sup>小鼠与Rosa26<sup>dn/dn</sup>小鼠杂交获得Osx<sup>Cre</sup>;Rosa26<sup>dn/-</sup>子一代(F1),将其与F1代Rosa26<sup>dn/-</sup>小鼠杂交即可获得实验



所需的同窝的 *Osx<sup>Cre</sup>* 小鼠与 *Osx<sup>Cre</sup>;Rosa26<sup>dn/dn</sup>* 小鼠。

小鼠出生 10 d 打耳标编号并剪取尾部末端 2~3 mm 组织,依据鼠尾基因鉴定试剂盒说明书提取 DNA:每个样本采用 50  $\mu$ L 组织消化液处理,55  $^{\circ}$ C 金属浴消化 15 min,置于 95  $^{\circ}$ C 金属浴孵育 5 min 灭活

表 1 小鼠基因型鉴定的 PCR 引物

Tab 1 PCR primers for mouse genotyping

Primer name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>dnRAR<math>\alpha</math>-mut</i>	ATGGTGTACACGTGTACACC	CACCTTCTCAATGAGCTCC
<i>dnRAR<math>\alpha</math>-wt</i>	CCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC	GAGCGGGAGAAATGGATATG
<i>OsxCre</i>	TGCCACGACCAAGTGACAGCAATG	ACCAGAGACGGAAATCCATCGCTC

Note: *OsxCre*—osterix promoter-Cre.

### 1.3.2 小鼠颅顶骨细胞、骨髓间充质干细胞分离与培养

(1) 小鼠颅顶骨细胞分离培养 将 2 周龄 *Osx<sup>Cre</sup>* 小鼠、*Osx<sup>Cre</sup>;Rosa26<sup>dn/dn</sup>* 小鼠、*Rosa26<sup>dn/dn</sup>* 小鼠安乐死。剪取颅顶骨置于含 2% 双抗的无菌 PBS 中,于冰上用含 2% 双抗的无菌 PBS 浸洗 2 次,每次 5 min。配置含 3 mg/mL I 型胶原酶、4 mg/mL II 型 Dispase 酶的消化液,消化液经孔径 40  $\mu$ m 滤网过滤后置于 37  $^{\circ}$ C 水浴锅中预热;向颅顶骨中加入 1 mL 消化液,使用无菌剪刀将颅顶骨剪碎为 1 mm $\times$ 1 mm 大小的骨块,37  $^{\circ}$ C 摇床上消化 35 min;配置含  $\alpha$ -MEM 培养基、2% 双抗的中和液;按照 1:3 的体积比,吸取不含骨块的消化液上清液与中和液混合,置于冰上备用。将上述消化步骤重复 1 次。取消化液与中和液混合体系 400  $\times$ g 离心 5 min,重悬获得颅顶骨原代细胞,完全培养基 (10% FBS+1% 双抗  $\alpha$ -MEM) 培养。

(2) 小鼠股骨骨髓间充质干细胞分离培养 将 2 周龄 *Osx<sup>Cre</sup>* 小鼠、*Osx<sup>Cre</sup>;Rosa26<sup>dn/dn</sup>* 小鼠、*Rosa26<sup>dn/dn</sup>* 小鼠安乐死。取股骨置于无菌 PBS 中,于冰上用无菌持针器夹持股骨,无菌剪刀剪除股骨两端暴露骨髓腔,1 mL 注射器吸取少量  $\alpha$ -MEM 培养基,多次冲洗骨髓腔,直至骨骼呈现完全乳白色。收集骨髓腔冲洗后的培养基,400  $\times$ g 离心 5 min 后重悬,完全培养基培养,培养所得贴壁细胞即为骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cell, BMSC)。

1.3.3 体外成骨诱导 取“1.3.2”中使用完全培养基培养的小鼠颅顶骨细胞与股骨 BMSC,培养 3 d 后吸除一半体积的原培养基,用新的完全培养基进行半换液,培养 6 d 后使用完全培养基换液,培养 7 d 后按  $2\times 10^5$  个/mL 的密度铺板。使用 30% 成骨诱导液培养

蛋白酶;13 000  $\times$ g 离心 5 min,取上清液作为 DNA 模板。按 2 $\times$ PCR mix 12.5  $\mu$ L、上下游引物各 1  $\mu$ L、DNA 模板 2.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L 的体系依次加样,PCR 扩增。配制 2.5% 琼脂糖凝胶,电泳检测。引物序列见表 1。

铺板后的细胞,进行成骨诱导,每 3 d 换液 1 次,第 7 日收集样品。

1.3.4 腺病毒感染和成骨诱导 取 *Rosa26<sup>dn/dn</sup>* 小鼠的颅顶骨细胞和股骨 BMSC,均按  $2\times 10^5$  个/mL 的密度接种于 24 孔板。铺板 16 h 后,待细胞融合度达 70%,按照课题组既往研究<sup>[14]</sup>报道的方法,以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 50 分别加入 Ad-eGFP、Ad-Cre 腺病毒。转染体系培养基总体积 250  $\mu$ L,4 h 后使用完全培养基补充至 500  $\mu$ L,8 h 后使用完全培养基全换液,24 h 后使用 30% 成骨诱导液对腺病毒感染的细胞进行成骨诱导,成骨诱导方法同“1.3.3”。

1.3.5 Western blotting 取成骨诱导的细胞,收取蛋白样品。95  $^{\circ}$ C 加热 10 min,在 SDS-PAGE 胶孔中加样 10  $\mu$ L,恒压 80 V 电泳 20 min,之后恒压 120 V 电泳 60 min;恒流 300 mA 湿法转膜 60 min,使用快速封闭液在 22  $^{\circ}$ C 摇床上封闭 60 min,1 $\times$ TBST 清洗后,剪取蛋白条带,分别使用 1:2 000 的 RAR $\alpha$  一抗稀释液与 1:1 000 的 GAPDH 一抗稀释液在 4  $^{\circ}$ C 摇床上孵育过夜。次日,1 $\times$ TBST 清洗 2 次,每次 10 min,使用 1:1 000 的 HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗稀释液在 22  $^{\circ}$ C 摇床孵育 60 min,1 $\times$ TBST 清洗 2 次,每次 10 min。ECL 化学发光试剂盒配置显影液,生物分子成像仪显影条带。

1.3.6 双荧光素酶报告基因检测 将未经成骨诱导的 *Osx<sup>Cre</sup>* 小鼠、*Osx<sup>Cre</sup>;Rosa26<sup>dn/dn</sup>* 小鼠的颅顶骨细胞,腺病毒感染的未经成骨诱导的 *Rosa26<sup>dn/dn</sup>* 小鼠颅顶骨细胞,均按  $2\times 10^5$  个/mL 的密度使用 250  $\mu$ L 完全培养基铺板于 24 孔板。铺板 12 h 后,每孔加入 25  $\mu$ L 无血清培养基配置的转染体系,其中包含 0.3  $\mu$ L Renilla、1  $\mu$ L 质粒、0.3  $\mu$ L Lipo8000。转染 4 h 后补充完全培养基至 500  $\mu$ L 体积。48 h 后收样,弃上清液,PBS

清洗2次,加80  $\mu\text{L}$  报告基因专用裂解液;4  $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育20 min后,轻刮培养孔底部并吸取裂解液,4  $^{\circ}\text{C}$  下12 000 $\times g$  离心10 min,取上清液备用。于多标记微孔板检测系统专用96孔板中,每孔加入10  $\mu\text{L}$  上清液、50  $\mu\text{L}$  报告基因荧光缓冲液,吹打混匀,460 nm 波长检测荧光强度;加入50  $\mu\text{L}$  报告基因终止缓冲液,吹打混匀,检测荧光强度。实验设置8组:①  $Osx^{Cre}$  小鼠颅顶骨细胞+PGL3-basic。②  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠颅顶骨细胞+PGL3-basic。③  $Osx^{Cre}$  小鼠颅顶骨细胞+RARE-Luc。④  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠颅顶骨细胞+RARE-Luc。⑤ Ad-eGFP 腺病毒感染的  $Rosa26^{dn/dn}$  小鼠颅顶骨细胞+PGL3-basic。⑥ Ad-Cre 腺病毒感染的  $Rosa26^{dn/dn}$  小鼠颅顶骨细胞+PGL3-basic。⑦ Ad-eGFP 腺病毒感染的  $Rosa26^{dn/dn}$  小鼠颅顶骨细胞+RARE-Luc。⑧ Ad-Cre 腺病毒感染的  $Rosa26^{dn/dn}$  小鼠颅顶骨细胞+RARE-Luc。加入PGL3-basic质粒组为各实验组的空白对照,所用分析方法同课题组既往研究<sup>[14]</sup>。

**1.3.7 小鼠颅颌面骨 Micro-CT 与三维重建** 取6周龄  $Osx^{Cre}$  小鼠、 $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠安乐死,分离颅骨暂存于1 $\times$ PBS中。Micro-CT扫描全头颅(精度10  $\mu\text{m}$ )获取dicom文件,导入Mimics Medical 17.0软件,依据文献<sup>[14]</sup>三维重建各颅颌面部骨块。使用Mimics Medical 17.0软件Measure-Distance工具测量上颌前骨最前点至枕骨最后点之间的距离,记作颅骨长度;测量顶骨左右两侧最突点之间的距离,记作颅骨宽度;测量下颌髁突最后点至切牙牙槽骨最前点之间的距离,记作下颌骨长度;于Mimics Medical 17.0软件3D-objects-Properties-Info-Volume模块读取各颅颌面部骨块重建后的体积数值。

## 1.4 统计学分析

使用GraphPad Prism 5软件绘图。定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用SPSS 24.0软件包进行独立样本 $t$ 检验,分析组间差异。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 小鼠杂交配繁及基因型鉴定

运用Cre-LoxP重组酶系统,设计并构建成骨细胞  $dnRAR\alpha$  条件性过表达小鼠(图1)。将  $Osx^{Cre}$  小鼠与  $Rosa26^{dn/dn}$  小鼠杂交获得F1代的  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  雄性小鼠与  $Rosa26^{dn/dn}$  雌性小鼠,进一步杂交后获得同

窝  $Osx^{Cre}$  小鼠与  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠(图2A)。观察发现,  $Osx^{Cre}$  与  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠出生后均能存活至12周龄以上,为研究VAD所致颅颌面骨畸形的相关病理机制与下游靶向干预提供了可靠条件。

通过鼠尾基因型鉴定分析小鼠杂交过程中可能出现的基因型结果。根据电泳结果,  $dn wt$  有条带而  $dn mut$  没有条带基因型为  $Rosa26^{-/-}$ ,  $dn wt$ 、 $dn mut$  均有条带基因型为  $Rosa26^{dn/-}$ ,  $dn wt$  没有条带而  $dn mut$  有条带基因型为  $Rosa26^{dn/dn}$ , Cre有无条带分别表示  $Osx^{Cre}$ 、非  $Osx^{Cre}$ 。结果证实  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠成功构建,具体表现为  $dn wt$  没有条带、 $dn mut$  有条带、Cre有条带(图2B)。

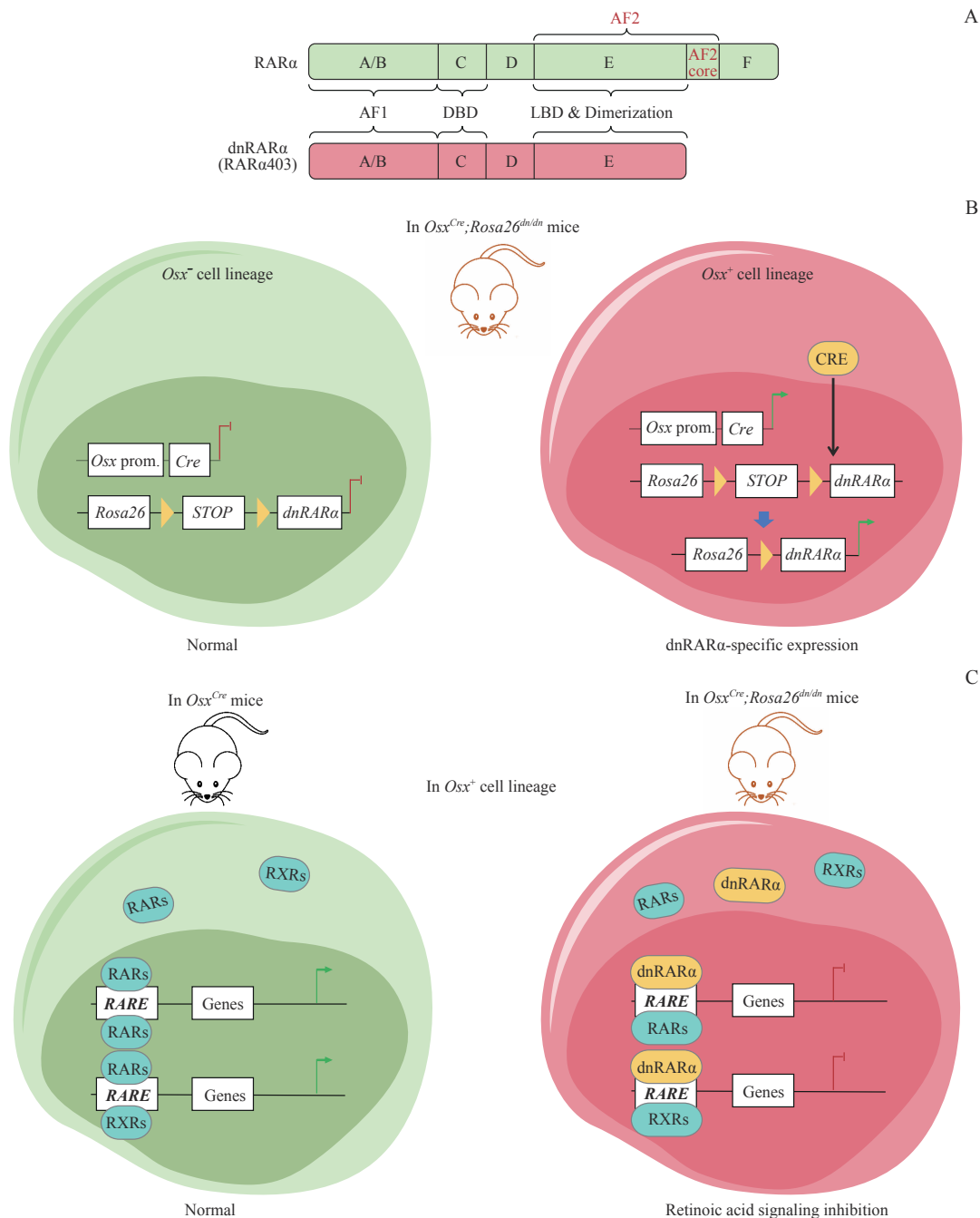
## 2.2 $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$ 小鼠成骨细胞视黄酸信号分析

为验证模型小鼠包括股骨、颅骨在内的骨组织中成骨细胞条件性视黄酸信号失活效率,取  $Osx^{Cre}$  和  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  小鼠股骨BMSC与颅顶骨细胞,成骨诱导后提取蛋白。Western blotting结果显示  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  组RAR $\alpha$  蛋白表达水平较  $Osx^{Cre}$  组升高(图3A、B),提示  $dnRAR\alpha$  蛋白过表达。同时,双荧光素酶报告基因实验结果显示  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  组小鼠成骨细胞的RARE活性显著低于  $Osx^{Cre}$  组(图3C),提示视黄酸信号通路阻断,进一步证实了  $dnRAR\alpha$  蛋白表达且发挥了显性负突变功能。上述结果表明  $Osx^{Cre};Rosa26^{dn/dn}$  模型小鼠成功实现成骨细胞条件性视黄酸信号失活,可从功能上模拟VAD。

## 2.3 体外 Cre 腺病毒感染体系成骨细胞视黄酸信号分析

进一步探究Cre-LoxP重组酶表达体系是否可在体外实验中使视黄酸信号失活。取2周龄  $Rosa26^{dn/dn}$  小鼠原代股骨BMSC与颅顶骨细胞,分别感染Ad-eGFP、Ad-Cre腺病毒,成骨诱导后提取蛋白。Western blotting结果显示,Ad-Cre组RAR $\alpha$  蛋白表达水平较Ad-eGFP组升高(图4A、B),提示  $dnRAR\alpha$  蛋白过表达。同时,双荧光素酶报告基因实验结果显示Ad-Cre组小鼠成骨细胞RARE活性低于Ad-eGFP组(图4C),提示视黄酸信号通路阻断。

以上结果表明,该Cre-LoxP系统构建的显性负突变蛋白表达体系在体内外均能稳定表达并发挥信号通路阻断作用。



**Note:** A. Schematic diagram of the structure of the dominant negative protein dnRARα. B. Schematic diagram of the Cre-LoxP system in *Osx<sup>+</sup>* cell lineage of *Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice. C. Schematic diagram of the activity of retinoic acid signaling in *Osx<sup>+</sup>* cell lineage of *Osx<sup>Cre</sup>* mice and *Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice. AF1—activation function 1; AF2—activation function 2; DBD—DNA binding domain; LBD—ligand binding domain; prom.—promoter.

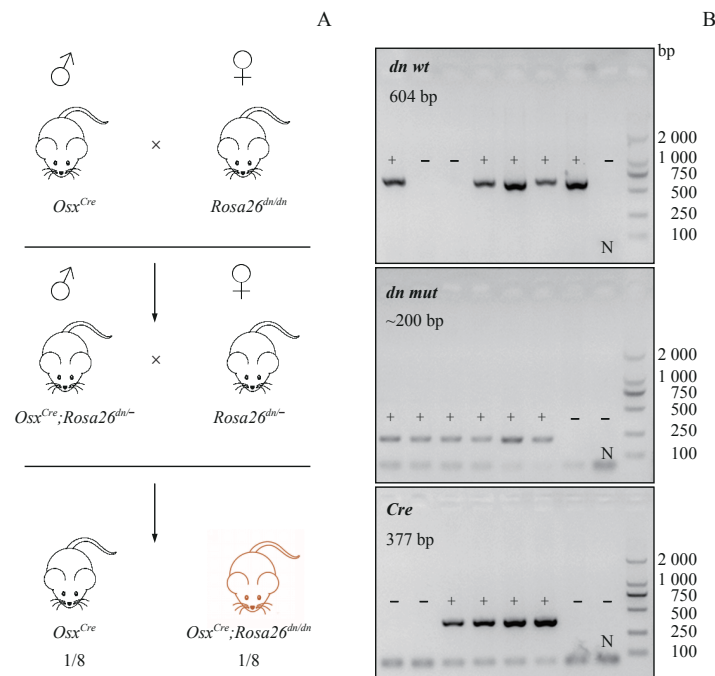
图1 Cre-LoxP系统实现dnRARα基因条件性表达的原理示意图

Fig 1 Schematic diagram of conditional dnRARα gene expressing by Cre-LoxP system

## 2.4 *Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>*小鼠颅颌面骨畸形分析

进一步探究该模型小鼠是否表现出颅颌面骨畸形。取6周龄同窝 *Osx<sup>Cre</sup>* 小鼠与 *Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>* 小鼠颅颌骨，Micro-CT (图 5A) 联合各骨块三维重建 (图 5B) 的分析结果显示：*Osx<sup>Cre</sup>; Rosa26<sup>dn/dn</sup>* 小鼠颅骨长度较 *Osx<sup>Cre</sup>* 小鼠减小 ( $P < 0.05$ , 图 5C)，颅骨宽度与 *Osx<sup>Cre</sup>* 小鼠无明显差异 ( $P > 0.05$ , 图 5D)，下颌骨短

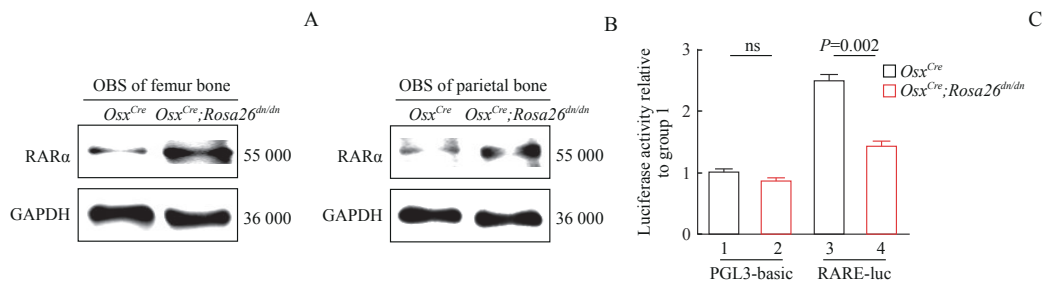
小 ( $P < 0.05$ , 图 5E)，额骨、鼻骨、枕骨等存在骨缺损 (图 5F)，下颌骨、鼻骨、额骨、顶骨、间顶骨、枕骨、上颌前骨、上颌骨等均体积减小 (图 5G)。以上结果提示成骨细胞视黄酸信号失活可导致以颅颌面骨形成不全、骨发育不足为主要表现的VAD样颅颌面骨畸形，表明本研究构建的模型成功模拟了VAD样颅颌面骨畸形。



**Note:** A. Schematic diagram of hybridization strategy among mice. B. Genotype identification by tails of mice. N—negative control.

图2 小鼠杂交方案与基因型鉴定

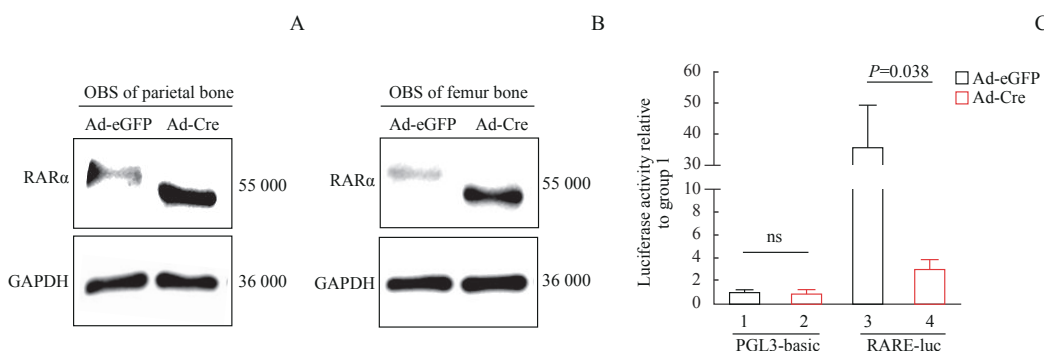
Fig 2 Mouse hybridization and genotyping



**Note:** A. The RARα protein level of femur bone BMSCs after osteogenic induction from *Osx*<sup>Cre</sup> mice and *Osx*<sup>Cre</sup>;*Rosa26*<sup>dn/dn</sup> mice by Western blotting. B. The RARα protein level of parietal bone cells after osteogenic induction from *Osx*<sup>Cre</sup> mice and *Osx*<sup>Cre</sup>;*Rosa26*<sup>dn/dn</sup> mice by Western blotting. C. The RARE activity of parietal bone cells from *Osx*<sup>Cre</sup> mice and *Osx*<sup>Cre</sup>;*Rosa26*<sup>dn/dn</sup> mice by dual luciferase gene reporter assay. PGL3-basic is blank plasmid group. OBS—osteoblast; ns—no significant difference.

图3 *Osx*<sup>Cre</sup>;*Rosa26*<sup>dn/dn</sup> 小鼠成骨细胞视黄酸信号失活效率验证

Fig 3 Verification of the inhibition of osteoblastic retinoic acid signaling in *Osx*<sup>Cre</sup>;*Rosa26*<sup>dn/dn</sup> mice

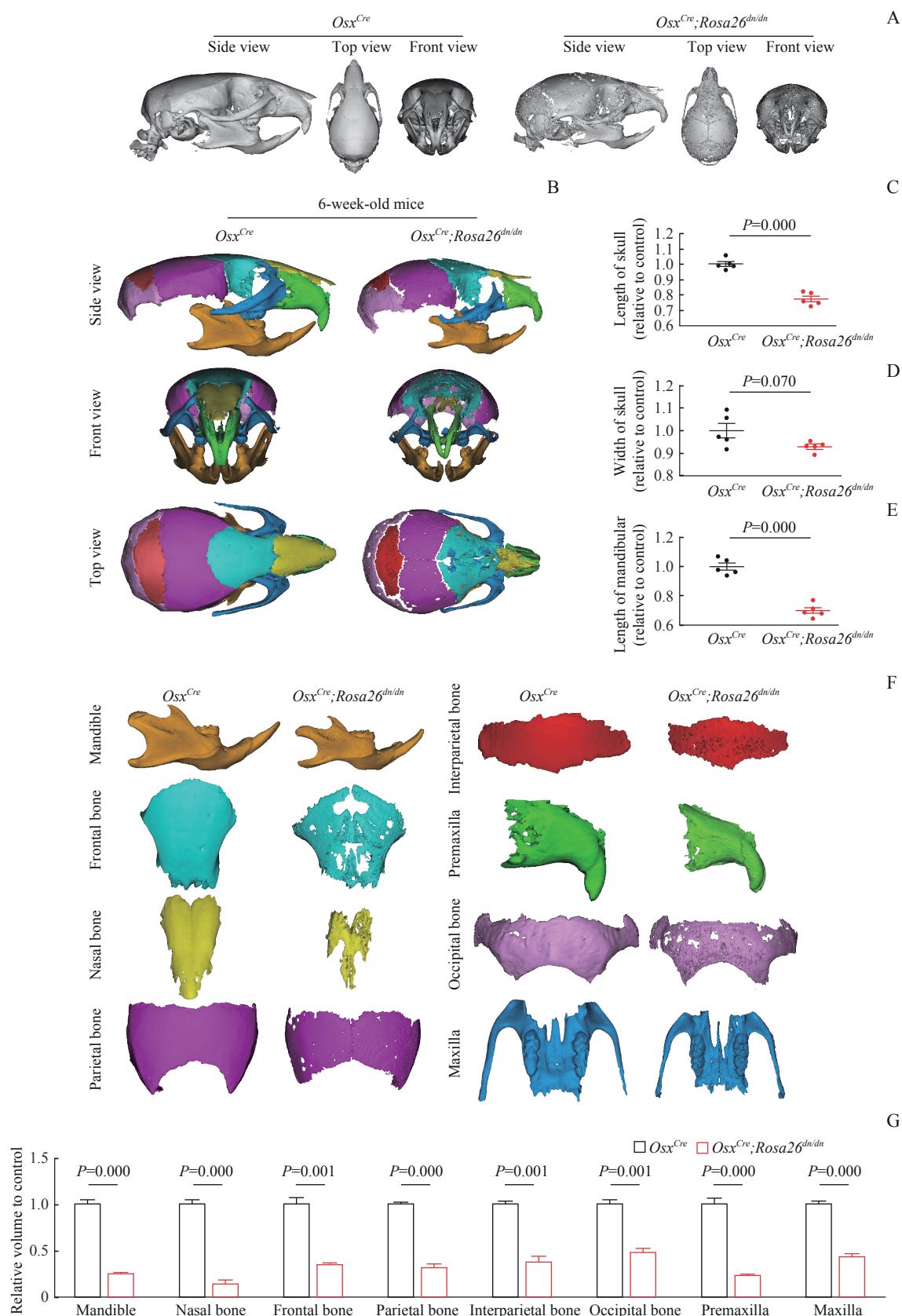


**Note:** A. The RARα protein level of adenovirus-infected femur bone BMSCs after osteogenic induction from *Rosa26*<sup>dn/dn</sup> mice detected by Western blotting. B. The RARα protein level of adenovirus-infected parietal bone cells after osteogenic induction from *Rosa26*<sup>dn/dn</sup> mice detected by Western blotting. C. The RARE activity of adenovirus-infected parietal bone cells from *Rosa26*<sup>dn/dn</sup> mice detected by dual luciferase gene reporter assay. PGL3-basic is blank plasmid group. ns—no significant difference; OBS—osteoblast.

图4 Cre-LoxP 系统体外成骨细胞视黄酸信号失活效率验证

Fig 4 Verification of the inhibition of osteoblastic retinoic acid signaling by Cre-LoxP system *in vitro*





**Note:** A. The three-dimensional (3D) reconstruction of the Micro-CT of 6-week-old mouse skulls. B. Bone segmentation of the mouse skulls. C. Analysis of the length of skulls. D. Analysis of the width of skulls. E. Analysis of the length of mandibles. F. The 3D reconstruction of the craniofacial bones. G. Analysis of the volume of craniofacial bones, including mandible, nasal bone, frontal bone, parietal bone, interparietal bone, occipital bone, premaxilla, and maxilla.

**图5** *Osx<sup>Cre</sup>;Rosa26<sup>dn/dn</sup>*小鼠颅颌面骨畸形分析

**Fig 5** Craniofacial skeletal deformity analysis of *Osx<sup>Cre</sup>;Rosa26<sup>dn/dn</sup>* mice



### 3 讨论

维生素A是人类发育与骨骼生长所需的重要营养物质。母体视黄酸缺乏、炎症及消化功能异常等病因均可导致VAD<sup>[15]</sup>。VAD发病率较高,在发展中国家更为严重,表现为全身多系统疾病,包括小眼畸形、唇腭裂等颅颌面畸形、心血管畸形、泌尿系统畸形、四肢畸形等<sup>[16]</sup>。其中,VAD所致胎儿先天颅颌面骨畸形以骨量降低为重要特征,患者通常表现为颅骨发育不全、骨质不良和膜内成骨异常,在下颌骨内侧缘尤为显著<sup>[17]</sup>。在动物模型方面,VAD同样可导致多种哺乳动物颅颌面骨形成不全的畸形。既往通过饮食中维生素A不足建立的VAD模型小鼠在胎龄21.5 d(E21.5)表现出显著的颅颌面骨发育不良,相对正常小鼠表现为颅骨长度缩短,下颌骨、上颌骨、额骨、鼻骨长度缩短,顶骨、间顶骨、枕骨体积减小,提示骨发育不全<sup>[18]</sup>。通过饮食维生素A不足建立的VAD大鼠模型也呈现出颅骨长度明显缩短<sup>[19]</sup>、颅骨及上下颌骨发育不足<sup>[20]</sup>、切牙萌出迟缓等颅颌面骨畸形,同时长骨与颅骨的骨矿化程度与胶原合成水平均降低,呈现显著的骨形成不全<sup>[21]</sup>,且在维生素A摄入极低时胚胎死亡。上述表型与本研究新构建的疾病动物模型呈现的颅颌面骨畸形表型非常相似,提示本模型可模拟VAD样颅颌面骨畸形。

视黄酸通过视黄酸信号通路发挥生物学功能。RAR介导的RARE激活基因转录是视黄酸信号通路的核心环节<sup>[9]</sup>。LOHNES等<sup>[7]</sup>构建 $RAR\alpha^{-/-}RAR\gamma^{-/-}$ 小鼠模拟VAD以研究其致病机制,发现小鼠体型显著减小,几乎所有颅颌面部骨骼形成受损,其中上颌骨严重畸形、发育不全、上切牙缺失,颅顶表现为严重骨化不全、额骨与顶骨缩短、间顶骨与枕骨的骨化中心均消失,呈现严重的颅颌面骨发育不全畸形;但由于小鼠胚胎期即出现死亡,未能进一步研究下游机制。本研究构建了规避RAR家族补偿效应、出生后存活、可模拟VAD样颅颌面骨畸形的疾病小鼠模型,为VAD样颅颌面骨畸形发生机制与防治靶点的研究提供了新的模型。作者团队前期已对新生鼠颅顶骨视黄酸信号抑制效率做过验证<sup>[14]</sup>。本研究针对2周龄小鼠股骨与颅顶骨的成骨细胞及在体外Cre腺病毒感染敲除体系中,全面验证了该模型成骨细胞视黄酸信号特异性阻断的效率,为基于该模型疾病发生机制与干预研究的后续开展提供了可靠证据。

值得注意的是,维生素A及视黄酸对骨发育的作用尚存在争议<sup>[22]</sup>。既往研究<sup>[9]</sup>已报道了诸多结论相异的动物模型或临床研究,其本质原因在于视黄酸对骨发育的调控是一个动态平衡的过程,过多或过少的视黄酸均会导致骨发育异常及颅颌面骨畸形。一方面,20世纪中期,临床发现孕期母体维生素A摄入不足可导致新生儿VAD,表现出颅颌面骨畸形、眼畸形、唇腭裂、心血管畸形、生殖功能不全等一系列畸形,严重者发生死亡<sup>[23]</sup>。另一方面,1985年,LAMMER等<sup>[24]</sup>报道了视黄酸用于治疗孕期严重顽固性囊性痤疮,会导致胎儿流产及包括颅颌面发育畸形在内的多种畸形。因此,视黄酸信号的适度激活与稳态维持是颅颌面正常发育的重要保证;阐明视黄酸信号对颅颌面组织发育的调控机制是预防和治疗视黄酸代谢紊乱相关颅颌面畸形的关键<sup>[25]</sup>。尽管公认VAD在人类、小鼠、大鼠、狗、牛、猪、狮子、猎豹等一系列哺乳动物中均会导致颅颌面骨发育不全畸形<sup>[26]</sup>,但在颅骨厚度及相应成骨破骨活性上,既往多项动物模型得出了不同的结论。在小鼠与大鼠因饮食结构异常导致的VAD模型中,各颅颌面骨块均显著减小,表现出严重的骨形成不全与矿化不全,上下颌骨缩短<sup>[27]</sup>,这与本模型的颅颌面骨畸形表型非常相似。而在牛、狮子与猎豹因饮食结构异常导致的VAD模型中,则出现枕骨异常增生的表型<sup>[28]</sup>;这种表型于2015年在1例3岁后开始饮食结构异常的男性病例中得到了印证,但由于该患者是否在母体阶段即处于VAD环境缺乏病史证据,尚存在争议<sup>[29]</sup>。总之,尚需基于更多可靠的VAD样疾病模型探究其致病机制与潜在干预途径。

同时,本模型是条件性基因编辑模型。*Osx-Cre*是经典的成骨细胞标志物,因而我们推测成骨细胞及其谱系视黄酸信号紊乱可能是VAD样颅颌面骨畸形的关键病因。研究结果也提示成骨细胞视黄酸信号通路在颅颌面骨发育过程中具有重要作用。需要注意的是,CHEN等<sup>[30]</sup>发现*Osx-Cre*除了主要标记成骨细胞及其下游谱系之外,还能标记成脂细胞、血管周细胞等。关于其他相关细胞的视黄酸信号通路在颅颌面骨发育过程中的作用,尚待未来寻找更加具特征性的细胞标志物并构建Cre-LoxP体系来验证。

既往已有部分研究聚焦视黄酸对成骨活性及成骨细胞的功能调控,但其具体调控作用颇具争议。在成骨细胞分化过程中,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,

ALP) 与 I 型胶原蛋白 (collagen type I, COL1) 等早期标志物较早表达, 随后较晚表达的成骨标志物, 包括骨钙蛋白 (osteocalcin, OCN) 和骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 等<sup>[31]</sup>。研究<sup>[32]</sup>发现维生素 A 可通过 RAR 介导的特征信号表达促进成骨细胞早期分化, 较低剂量 (1~100 nmol/L) 的视黄酸干预可促进成骨前体细胞系 (MC3T3-E1) 成骨分化, 表现为 ALP 活性增强和 OPN 表达增多。然而, 由于疾病动物模型构建技术的限制, 既往研究并未能在体内证实前述的成骨分化能力增强是视黄酸作用于成骨细胞自身所导致, 还是视黄酸作用于其他细胞后通过细胞间交互作用影响成骨细胞。实际上生命体的全身骨骼存在多个不同的亚结构, 如颅骨、长骨皮质骨、长骨松质骨、椎骨等, 不同的亚结构中成骨细胞的视黄酸信号通路也可能存在不同的作用及潜在机制<sup>[33]</sup>。这一观点已在部分其他骨发育畸形相关综合征中得到印证<sup>[34]</sup>。而本研究运用的成骨细胞条件性基因编辑技术<sup>[35]</sup>, 创新性证实了成骨细胞响应视黄酸信号这一生物学过程在颅颌面骨发育过程中的重要作用, 也为探究成骨细胞视黄酸信号失活对颅颌面骨成骨活性及成骨细胞功能的影响提供了新思路与新途径。

综上, 本研究运用 Cre-LoxP 系统条件性显性负突变基因过表达技术构建了新的 VAD 疾病动物模型。该模型可在成骨细胞中条件性失活视黄酸信号通路功能, 小鼠出生后可存活且表现出颅颌面骨畸形, 显示了成骨细胞视黄酸信号通路在颅颌面骨发育过程中的重要作用。该模型也为未来对于视黄酸信号紊乱相关颅颌面骨畸形及其他骨相关疾病的诊断、治疗与预防研究提供了新的模型与思路。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no conflict of interests.

#### 伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究相关动物实验通过上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物伦理委员会伦理审查批准 (批件号: SH9H-2022-A108-SB)。本实验对动物的处理方法符合《关于善待实验动物的指导性意见》的要求, 所有动物实验操作遵守我国实验动物相关法律规定以及上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物有关的各项规章制度和操作规范, 确保动物福利的实施。

The animal experiments in this study were approved by the Ethics Committee of Experimental Animals of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval No. SH9H-2022-A108-SB). The method of animal experiments in this study complies with the *Guiding Opinions on Treating Experimental Animals*. All animal experimental operations comply with relevant laws and regulations on experimental animals in China, as well as various rules and operating norms in Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, to ensure the implementation of animal welfare.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

孙思远负责细胞实验、表型鉴定、数据整理和分析、论文撰写; 孙思远和刘媛琪负责实验动物培育、基因型鉴定; 崔怡雯协助购买试剂、参与实验分析; 黄紫晗协助资料收集; 梅李和代庆刚负责实验数据分析及相关指导、论文修改; 江凌勇负责实验设计、研究指导、论文修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

SUN Siyuan performed experiments, data organization and analysis, and paper writing; SUN Siyuan and LIU Yuanqi performed animal breeding and genotyping; CUI Yiwen helped with reagents purchasing and data analysis; HUANG Zihan helped with information collecting; MEI Li and DAI Qinggang helped with data analysis and related guidance, and paper revision; JIANG Lingyong was responsible for experiment design, research guidance, and paper revision. All authors have read the last version of the manuscript and consented to submission.

- Received: 2024-02-01
- Accepted: 2024-03-21
- Published online: 2024-06-28

#### 参 · 考 · 文 · 献

- [1] TIERNEY M T, POLAK L, YANG Y H, et al. Vitamin A resolves lineage plasticity to orchestrate stem cell lineage choices[J]. *Science*, 2024, 383(6687): eadi7342.
- [2] SEUFERT J, KRISHNAN N, DARMSTADT G L, et al. Subnational estimates of vitamin A supplementation coverage in children: a geospatial analysis of 45 low- and middle-income countries[J]. *Public Health*, 2024, 228: 194-199.
- [3] O'CONNOR E A, EVANS C V, IVLEV I, et al. Vitamin and mineral supplements for the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: updated evidence report and systematic review for the US preventive services task force[J]. *JAMA*, 2022, 327(23): 2334-2347.
- [4] CHAKRABORTY U, CHANDRA A. Bitot's spots, dry eyes, and night blindness indicate vitamin A deficiency[J]. *Lancet*, 2021, 397(10270): e2.
- [5] SHEFTEL J, VAN STUIJVENBERG M E, DHANSAY M A, et al. Chronic and acute hypervitaminosis A are associated with suboptimal anthropometric measurements in a cohort of South African preschool children[J]. *Am J Clin Nutr*, 2022, 115(4): 1059-1068.
- [6] GHYSELINCK N B, DUESTER G. Retinoic acid signaling pathways[J]. *Development*, 2019, 146(13): dev167502.

- [7] LOHNES D, MARK M, MENDELSON C, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development ( I ). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants[J]. *Development*, 1994, 120(10): 2723-2748.
- [8] ONO K, SANDELL L L, TRAINOR P A, et al. Retinoic acid synthesis and autoregulation mediate zonal patterning of vestibular organs and inner ear morphogenesis[J]. *Development*, 2020, 147(15): dev192070.
- [9] ABADIE R B, STAPLES A A, LAUCK L V, et al. Vitamin A-mediated birth defects: a narrative review[J]. *Cureus*, 2023, 15(12): e50513.
- [10] DAMM K, HEYMAN R A, UMESONO K, et al. Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(7): 2989-2993.
- [11] CUNNINGHAM C J, CHOI R B, BULLOCK W A, et al. Perspective: the current state of Cre driver mouse lines in skeletal research—challenges and opportunities[J]. *Bone*, 2023, 170: 116719.
- [12] GEMBERLING M P, SIKLENKA K, RODRIGUEZ E, et al. Transgenic mice for *in vivo* epigenome editing with CRISPR-based systems[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(8): 965-974.
- [13] ROSSELOT C, SPRAGGON L, CHIA I, et al. Non-cell-autonomous retinoid signaling is crucial for renal development[J]. *Development*, 2010, 137(2): 283-292.
- [14] DAI Q, SUN S, JIN A, et al. Osteoblastic RAR inhibition causes VAD-like craniofacial skeletal deformity[J]. *J Dent Res*, 2023, 102(6): 667-677.
- [15] VICTORA C G, CHRISTIAN P, VIDALETI L P, et al. Revisiting maternal and child undernutrition in low-income and middle-income countries: variable progress towards an unfinished agenda[J]. *Lancet*, 2021, 397(10282): 1388-1399.
- [16] NUREDIN A, MELIS T, ABDU A O. Clinical vitamin A deficiency among preschool aged children in Southwest Ethiopia[J]. *Front Nutr*, 2024, 11: 1267979.
- [17] SCHMIDT M J, STEENKAMP G, CALDWELL P, et al. Radiographic analysis of the thickness of the cranial bones in captive compared to wild-living cheetahs and in cheetahs with hypovitaminosis A[J]. *PLoS One*, 2021, 16(8): e0255924.
- [18] WANG F P, TANG Y W, CAI Y J, et al. Intrafollicular retinoic acid signaling is important for luteinizing hormone-induced oocyte meiotic resumption[J]. *Genes*, 2023, 14(4): 946.
- [19] BAYBUTT R C, STANDARD J T, DIM D, et al. Cod liver oil, but not retinoic acid, treatment restores bone thickness in a vitamin A-deficient rat[J]. *Nutrients*, 2022, 14(3): 486.
- [20] PETRELLI B, BENDELAC L, HICKS G G, et al. Insights into retinoic acid deficiency and the induction of craniofacial malformations and microcephaly in fetal alcohol spectrum disorder[J]. *Genesis*, 2019, 57(1): e23278.
- [21] FIRSCHEIN H E. Collagen and mineral accretion rates in bone during vitamin A deficiency[J]. *Am J Physiol*, 1970, 219(5): 1183-1187.
- [22] KNAPIK J J, HOEDEBECKE S S. Vitamin A and bone fractures: systematic review and meta-analysis[J]. *J Spec Oper Med*, 2021, 21(2): 100-107.
- [23] TIMBERLAKE A T, MCGEE S, ALLINGTON G, et al. *De novo* variants implicate chromatin modification, transcriptional regulation, and retinoic acid signaling in syndromic craniosynostosis[J]. *Am J Hum Genet*, 2023, 110(5): 846-862.
- [24] LAMMER E J, CHEN D T, HOAR R M, et al. Retinoic acid embryopathy[J]. *N Engl J Med*, 1985, 313(14): 837-841.
- [25] WU Y, KUROSAKA H, WANG Q, et al. Retinoic acid deficiency underlies the etiology of midfacial defects[J]. *J Dent Res*, 2022, 101(6): 686-694.
- [26] LOKKEN-TOYLI K L, DIAZ-OCCHOA V E, CAMACHO L, et al. Vitamin A deficiency impairs neutrophil-mediated control of *Salmonella* via SLC11A1 in mice[J]. *Nat Microbiol*, 2024, 9(3): 727-736.
- [27] YU H R, WU J, LI K X, et al. Integrated analysis of murine cornea identifies JAK/STAT signaling pathway upregulated specifically in female vitamin A deficient mice[J]. *Exp Eye Res*, 2023, 237: 109714.
- [28] RADHAKRISHNAN R, LEUNG M, ROEHRICH H, et al. Mice lacking the systemic vitamin A receptor RBPR2 show decreased ocular retinoids and loss of visual function[J]. *Nutrients*, 2022, 14(12): 2371.
- [29] CHIU M, WATSON S. Xerophthalmia and vitamin A deficiency in an autistic child with a restricted diet[J]. *BMJ Case Rep*, 2015, 2015: bcr2015209413.
- [30] CHEN J Q, SHI Y, REGAN J, et al. Osx-Cre targets multiple cell types besides osteoblast lineage in postnatal mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85161.
- [31] BOK S, YALLOWITZ A R, SUN J, et al. A multi-stem cell basis for craniosynostosis and calvarial mineralization[J]. *Nature*, 2023, 621(7980): 804-812.
- [32] YEE M M F, CHIN K Y, IMA-NIRWANA S, et al. Vitamin A and bone health: a review on current evidence[J]. *Molecules*, 2021, 26(6): 1757.
- [33] LI Q W, XU R S, LEI K X, et al. Insights into skeletal stem cells[J]. *Bone Res*, 2022, 10(1): 61.
- [34] SUN J, HU L L, BOK S, et al. A vertebral skeletal stem cell lineage driving metastasis[J]. *Nature*, 2023, 621(7979): 602-609.
- [35] COLLINS M T, MARCUCCI G, ANDERS H J, et al. Skeletal and extraskeletal disorders of biomineralization[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18(8): 473-489.

[本文编辑] 崔黎明