

FAK/Twist1 信号通路在颅缝闭合过程中的作用机制研究

寇正雄^{1,2,3}, 张海燕⁴, 邵国^{2,3}, 张晓璐^{1,2,3}, 张春阳^{1,2,3}, 侯晓峰^{1,2,3}

摘要 目的 探究 FAK/Twist1 信号通路在颅缝闭合过程中的作用。方法 将 10 d 大鼠分为对照组(50 只)和颅缝旋转组(50 只),以大鼠人字缝中点为中心,直径约 0.5 cm 做一骨窗,将骨瓣在不损伤硬脑膜的情况下游离,对照组骨瓣原位复位,旋转组骨瓣旋转 180°后复位,两组大鼠 3 周后进行实验。旷场试验测试行为学,测量两组体质量、头围、骨瓣面积、骨瓣厚度等生理学指标,显微镜及 HE 染色观察颅缝闭合情况,Western blot、Real time PCR、免疫组化染色测定骨瓣及骨瓣下硬脑膜 FAK/Twist1 通过表达情况。结果 旋转组骨瓣厚度大于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),头围、体质量、骨瓣面积、术区面积无明显差异;显微镜下及 HE 染色中结果显示:旋转组颅缝完全闭合,对照组颅缝保持正常形态;行为学试验结果显示,颅缝闭合后大鼠行动能力下降且出现抑郁倾向;Western blot、Real time PCR、免疫组化染色显示:旋转组 FAK 在颅骨和硬脑膜中表达量均高于对照组且差异有统计学意义($P < 0.05$),旋转组 Twist1 在硬脑膜中表达量低于对照组且差异有统计学意义($P < 0.05$),在颅骨中两组 Twist1 表达量相近,差异无统计学意义。结论 颅缝旋转后可以导致颅缝早闭,并会出现行动能力下降等行为学异常,FAK/Twist1 可能在颅缝闭合过程中发挥着重要作用。

关键词 黏着斑激酶; Twist1; 颅缝闭合; 狭颅症; 信号通路; 颅缝旋转

中图分类号 R 651.1+1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)01-0060-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.011

在颅骨生长发育过程中,颅缝是骨形成的最重要部位,而颅缝形态的发生与表型的维持是组织间相互作用和调节的结果,特别是与硬脑膜间的相互作用^[1]。在硬脑膜与颅缝的相互作用中,又有诸多信号通路均起到了重要的调节作用,如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)信号通路、成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)信号通路等^[2]。而在近年的研究中表明,黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、Twist1 信号通路也发挥着至关重要的作用, Ghouzzi et al^[3]的实验已证实, Twist1 功能的杂合性丧失可以导致颅缝融合,并且在部分个体中会出现颅骨孔状缺损, FAK 可以通过软骨前体细胞与细胞外基质的相互作用抑制骨形成^[4]。FAK/Twist1 均来自于中胚层,是人体中广泛存在的信号通路,控制诸多细胞与组织功能。课题组前期研究显示, FAK 及 Twist1 的表达量在颅缝下硬脑膜与非缝线处硬脑膜存在明显的差异性,可以推测缝线处硬脑膜 FAK/Twist1 信号通路对颅缝有着特殊的作用,因此该实验通过建立 SD 大鼠颅缝旋转模型,以期阐明 FAK/Twist1 信号通路在颅缝闭合过程中的机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型 本研究选择购自中国医学科学院医学实验动物研究所(北京)的健康、繁殖力强且无特定病原体的成年 SD 大鼠作为亲代,由其出生第 10 天的大鼠幼鼠(公鼠)共 100 只作为研究对象,将试验对象随机分为两组各 50 只,分别为对照组、旋转组,每只鼠在术前均观察外观无明显畸形,体质量在(19.04 ± 1.07) g 区间内。

1.2 实验方法

1.2.1 手术方式 每只样本均需在术前观察无明显畸形外观,无明显行为学异常的健康鼠,配置 5% 水合氯醛溶液并根据 0.5 ml/100 g 予以腹腔麻醉,

2022-08-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160250, 81960238);内蒙古自治区自然科学基金(编号:2020MS08013, 2021MS08124);内蒙古卫生厅(编号:202202234);包头医学院科学基金项目(编号:BYJJ-QM 201928)

作者单位:¹ 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院神经外科,包头 014000

² 包头医学院神经外科疾病研究所(转化医学),包头 014000

³ 内蒙古自治区骨组织再生与损伤修复工程技术中心,包头 014000

⁴ 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院神经内三科,包头 014000

作者简介:寇正雄,男,主治医师,硕士研究生;

张春阳,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: Zhangchunyang1964@163.com;

侯晓峰,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: houxiaofeng1980@126.com

麻醉满意后俯卧于可调温鼠板,取顶枕部正中长约 2 cm 直切口,常规剃毛消毒后切开,显微器械钝性分离骨膜,暴露颅骨,旋转组:以人字缝中点为中心,直径 0.5 cm 做一骨窗,将骨窗游离,同时不损伤硬脑膜的前提下旋转 180° 后骨瓣复位。对照组:采取相同的手术方式,不同的是游离后骨瓣不进行旋转,原位复位(图 1)。手术后使用强生可吸收线缝合切口,放置于温箱,待麻醉醒后与母鼠同笼。两组均在刀锋显微外科手术显微镜下操作。手术后两组大鼠正常生长发育 3 周后,完成生理学指标检测及旷场行为学实验后处死,获得两组术区的硬脑膜(Dura)及颅骨(Skull)实验样本。

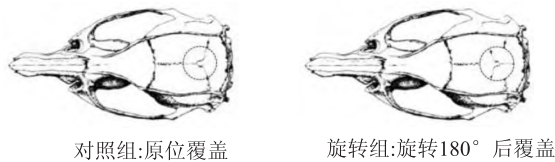


图 1 旋转组与对照组手术示意图

1.2.2 生理学指标 取材前随机选取 10 只大鼠进行生理学指标测量,测量前使用 50% 水合氯醛腹腔麻醉后致死,具体过程如下:

① 体质量的测量:使用小型实验动物体质量秤测量取材前体质量并记录,通过测量体质量,观察颅缝早闭是否对体质量存在影响,结合大体观察及行为学分析,是否存在因行动力下降、反应能力下降、智力降低等情况导致体质量下降。② 头围的测量:头围是评价颅骨及脑发育的重要指标^[5],软尺测量取材前头围发育情况,大鼠头骨基本量度指标采用兽类头骨使用频率较高的基本量度,各指标具体描述如下。颅全长(A 线):两前颌骨最前端中点到头骨顶部最后缘突出点的距离;眶间距(B 线):左右两侧眼眶前缘与泪管对应位置之间的距离;颅宽(C

线):两侧下颌角垂直于 A 线的连线的长度;眼宽(D 线):双侧眼眶外侧缘垂直于 A 线的连线长度。比较各经线长度的变化,两组对比是否存在差异性,探讨颅缝早闭对头围的影响。③ 骨瓣面积:游标卡尺于骨瓣不同位置随机测量直径至少 3 次,测量后取平均值,计算获得骨瓣面积,可以直接反应出颅缝早闭后,骨瓣是否仍然可以继续生长,对下一步实验有指导意义。④ 术区面积:游标卡尺同样的方式测量直径后计算术区面积,可明确颅缝早闭是否会对周围颅骨生长存在影响。⑤ 骨瓣厚度:游离骨瓣后分别从四个预定点位使用游标卡尺测量骨瓣厚度,通过测量骨瓣厚度可以发现颅缝早闭后颅骨厚度的变化,从而间接推出颅缝早闭后成骨细胞迁移与成骨方式的变化,详见图 2。

1.2.3 行为学实验 两组在手术后正常生长至 3 周时,分别随机抽取 10 只大鼠行旷场实验。旷场系统为长宽为 50 cm、高 40 cm 的方形箱子,旷场四壁及底部均为黑色,光亮程度为室内自然光,未在暗室及过度光照下进行,同时在实验过程中避免大鼠接触研究人员,避免外界任何外界刺激。用一只大鼠调试好系统后,将底板喷洒乙醇后擦拭干净,挥发 10 min 待乙醇气味完全消失后,将实验用鼠背对实验者轻放入旷场边缘一角,软件开始计时,实验持续 10 min,记录并测量两组总路程、四周及中心区域路程、移动速度静止时间等数据,记录并分析站立、修饰、排便等情况,观察两组在新异环境中的自主行为、运动能力、探究与紧张度的行为的差异性,探讨颅缝闭合情况对大鼠行为学的影响。每只小鼠实验结束后将底板用乙醇擦拭干净避免气味对后续实验的影响。

1.2.4 Western blot 获取两组大鼠幼鼠的颅骨与硬脑膜组织,由于样本质量较小,需每次选取 6 例样本混样后进行试验,重复至少 3 次,将颅骨与硬脑膜

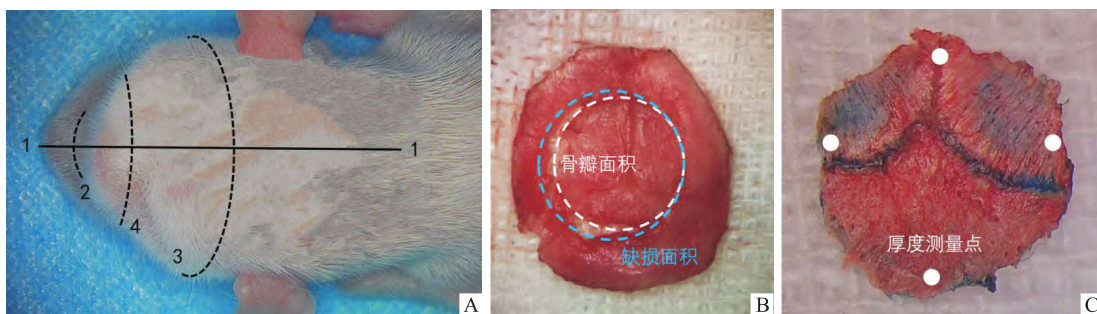


图 2 大鼠头骨基本量度指标、骨瓣面积及骨瓣厚度测量

A: 头围测量四条经线(1 号线为颅全长,2 号线为眶间距,3 号线为颅宽,4 号为眼宽);B: 测量骨瓣面积及缺损面积示意图;C: 颅骨厚度测量点

标本分别置于 1.5 ml 离心管中, 无菌剪尽可能剪碎, 加入 200 μ l 的细胞裂解液 + 2 μ l 的蛋白酶抑制剂后混匀, 置于超声破碎细胞, 释放蛋白, 于低温超速离心机中(4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min)离心 15 min 后取上清液利用 BCA 法测定浓度后按比例加入抗氧化剂与缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 金属浴 5 min, 在提前制好的聚丙烯酰胺凝胶中加入蛋白样本与蛋白 Marker, 置于电泳液中恒流 19 mA 通电可见 Marker 逐渐分层脱离浓缩胶时调整为恒流 29 mA, 待目标分子量的蛋白移动至中线位置附近时停止电泳, 取出凝胶将其蛋白电转 2 h 至 PVDF 膜上, 脱脂牛奶封闭 1.5 h 后孵育对应一抗(FAK/Twist1)过夜, TBST 缓冲液清洗后孵育荧光二抗 1.5 h, 再次洗净后通过荧光成像仪观察结果。

1.2.5 Real-time PCR 设计 real-time RCR 引物, 从基因库(GenBank)上查得大鼠 FAK 及 Twist1 基因与内参基因 β -actin 的基因序列, 根据序列采用 primer 5.0 软件进行 PCR 引物设计, 引物序列如表 1。

表 1 Real-time RCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
FAK	F: TGGACAGTCACAAAGTAAAGCACG
	R: TGGGTGGGGCAGTTCGTATT
Twist1	F: CCGGAGACCTAGATGTCATTGT
	R: CTGGGAATCTCTGTCCACCG
β -actin	F: GGCTGTATTCCCTCCATCG
	R: CCAGTTGTAACAATGCCATGT

利用 real-time PCR 试剂盒对两组大鼠幼鼠硬脑膜及颅骨组织中 FAK、Twist1 及 β -actin 的 mRNA 进行相对 PCR 分析, 具体步骤如下。取 6 例样本混样后进行试验, 将颅骨与硬脑膜标本分别置于 1.5 ml 离心管中, 无菌剪尽可能剪碎, 按照 real-time PCR 试剂盒说明书, 加入相应分组配置好反应液后, 加入 96 孔的 PCR 板中, 每孔加入 20 μ l 短暂离心。在 ABI 7900HT Real-time-PCR 反应仪上进行反应, 每组设置 3 个复孔, 用透明膜严实覆盖, 于离心机常温离心 10 min, 转速 5 000 r/min; 将 0.2 ml 透明半裙边 96 孔 PCR 板置于荧光定量 PCR 扩增仪 ABI 7900HT FAST 中进行检测, 参数设置如下: 95 $^{\circ}$ C \times 5 min 预变性; 95 $^{\circ}$ C \times 30 s 变性, 退火温度 30 s, 72 $^{\circ}$ C \times 30 s 延伸, 该步反复 40 次; 72 $^{\circ}$ C \times 2 min 再延伸; FAK 退火温度为 58 $^{\circ}$ C, Twist1 退火温度为 61 $^{\circ}$ C, β -actin 退火温度为 60 $^{\circ}$ C, 其余参数相同。Real-time PCR 反应结束后, 记录各样本的 Ct 值, 采

用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行定量分析, 结果以表示。

1.2.6 HE 与免疫组化染色 待将两组大鼠幼鼠处死后, 各取 3 个样本进行 4% 多聚甲醛脱水 48 h 后, 进行石蜡包埋, 修整好后置于石蜡切片机进行切片(厚 6 μ m), 待组织片漂浮后用载玻片将组织片捞起, 60 $^{\circ}$ C 烘箱内烤片 30 min, 经二甲苯 I 和 II 各脱蜡 10 min 后梯度酒精复水, 苏木精染色 3 min 后分化液浸泡 2 min, 吸取多余液体后伊红染色 30 s 后梯度酒精脱水, 二甲苯 I 和 II 透明 5 min 后中性树脂封片即完成 HE 染色。

另各组取样 3 个样本, 重复上述步骤至梯度酒精复水, 柠檬酸钠抗原修复液浸泡高温沸腾 20 min 后 PBST 清洗, 阻断剂避光孵育 20 min 后再次 PBST 清洗, 避光孵育一抗(FAK 与 Twist1, 稀释比例为 1 : 100), 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBST 清洗后孵育二抗(稀释比例 1 : 200), 再次 PBST 清洗后进行 DAB 显色, 置于荧光显微镜下观察并保存图像。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 统计学软件进行分析, 所有实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 每组实验至少重复 3 次, 两组实验数据采用 *t* 检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨瓣旋转后颅缝提前闭合 在手术显微镜下放大 2 \times 后可以看到, 出生 10 d 的大鼠在术后 3 周处死, 旋转组颅缝宏观上可见完全闭合, 而原位组颅缝清晰可见, 表明颅缝处硬脑膜在颅缝闭合过程中发挥着重要的作用, 将颅缝旋转避开颅缝处硬脑膜后, 颅缝提前闭合(图 3)。

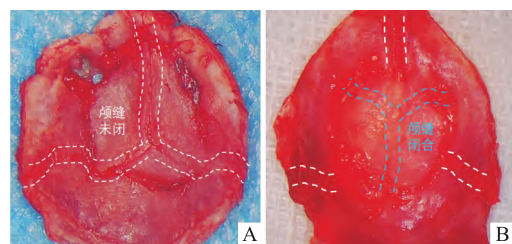


图 3 两组术后颅缝

A: 对照组显示颅缝存在 B: 旋转组显示颅缝已完全闭合

2.2 骨瓣厚度表现出明显差异 测量两组体质量、头围、术区面积、骨瓣面积以及骨瓣厚度, *t* 检验对两组数据进行分析, 只有骨瓣厚度差异有统计学意义($P = 0.003$, $P < 0.05$)。对照组骨瓣厚度平均值为(0.34 \pm 0.06) mm, 小于旋转组的(0.5 \pm 0.08) mm(表 2)。针对此种结果, 可能是旋转后颅缝骨

化,骨组织生长,使骨瓣厚度大于对照组。

表2 出生10 d大鼠幼鼠术后3周生理学数据($n=10, \bar{x} \pm s$)

生理学数据	对照组	旋转组	P 值
体质量(g)	94.87 ± 5.09	91.50 ± 10.41	0.49
A线(cm)	4.73 ± 0.10	4.76 ± 0.13	0.64
B线(cm)	1.36 ± 0.08	1.333 ± 0.08	0.50
C线(cm)	4.77 ± 0.77	4.87 ± 0.18	0.76
D线(cm)	2.13 ± 0.05	2.23 ± 0.16	0.18
骨瓣面积(mm ²)	32.19 ± 12.70	39.29 ± 11.52	0.33
术区面积(mm ²)	45.11 ± 11.62	46.47 ± 13.67	0.86
骨片平均厚度(mm)	0.34 ± 0.06	0.50 ± 0.08 ***	0.003

与对照组比较:*** $P < 0.001$

2.3 颅缝早闭后出现行为学异常 在对旷场实验数据进行分析,并使用 t 检验的方式对两组数据对比后,两组在总区域中的总路程、平均速度、静止时间的差异有统计学意义($P = 0.038, 0.014, 0.040, 0.003$),四角的路程、平均速度、静止时间的差异有统计学意义($P = 0.043, 0.039, 0.011$),四角的进入次数、持续时间 P 均 > 0.05 ,在其他数据中,包括:站立、排便、修饰等手动记录数据、四周、中央区域的路程、时间、平均速度及静止时间的差异均无统计学意义(表3)。

表3 旷场实验数据($n=10, \bar{x} \pm s$)

旷场实验	对照组	旋转组	P 值
总区域			
总路程(mm)	54 599 ± 9 825	46 103 ± 6 906 *	0.03
平均速度(mm/s)	91.07 ± 16.36	77.09 ± 11.58	0.04 *
静止时间(s)	145.4 ± 32.83	186.1 ± 18.54	0.003 ***
四角			
路程(mm)	35 742 ± 5 564	31 115 ± 3 801	0.04 *
持续时间(s)	484.3 ± 33.76	495.2 ± 23.45	0.41
平均速度(mm/s)	74.19 ± 12.87	63.11 ± 9.073	0.04 *
进入次数	46.3 ± 10.77	37.8 ± 8.28	0.06
静止时间(s)	131.1 ± 31.35	165.1 ± 22.03 *	0.01
四周			
路程(mm)	17 997 ± 4 821	14 131 ± 3 541	0.06
持续时间(s)	109.6 ± 33.44	97.83 ± 20.61	0.36
平均速度(mm/s)	169.2 ± 37.03	143.9 ± 18.01	0.07
进入次数	48 ± 11.88	39.7 ± 8.93	0.09
潜伏期(s)	5.625 ± 3.97	11.3 ± 12.20	0.18
静止时间(s)	13.41 ± 8.84	20.77 ± 9.59	0.09
中央			
路程(mm)	859.5 ± 666.7	857.4 ± 644.1	0.99
持续时间(s)	5.624 ± 5.12	5.08 ± 4.53	0.82
平均速度(mm/s)	126.9 ± 109.9	182 ± 101.3	0.26
进入次数	2.6 ± 1.89	2.7 ± 1.77	0.91
潜伏期(s)	308.2 ± 209.7	304.9 ± 209.5	0.97
静止时间(s)	0.928 ± 1.52	0.163 ± 0.37	0.14

与对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2.4 FAK/Twist1 在 Western blot 中表达情况

实验结果显示,FAK 主要表达于颅骨中, Twist1 主要表达于硬脑膜中,通过使用 Western blot 技术分别对旋转组、对照组的术区硬脑膜和颅骨的 FAK/Twist1 进行蛋白检测,结果显示 FAK 在颅骨组织中,旋转组表达量明显高于对照组,差异有统计学意义,在硬脑膜组织中,旋转组表达量低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4)。Twist1 在颅骨组织中,两组表达量相近,差异无统计学意义,在硬脑膜组织中,旋转组表达量低于对照组,差异有统计学意义(图4)。通过使用 real-time PCR 技术分别对旋转组、对照组的术区硬脑膜组织和颅骨组织的 FAK/Twist1 进行 mRNA 检测,结果与 Western blot 蛋白表达相符,FAK 在颅骨组织中,旋转组表达量明显高于对照组,差异有统计学意义,在硬脑膜组织中,旋转组表达量低于对照组,差异有统计学意义。Twist1 在颅骨组织中,两组表达量相近,差异无统计学意义,在硬脑膜组织中,旋转组表达量低于对照组,差异有统计学意义(图5)。

2.5 FAK/Twist1 在 HE 和免疫组化中表达情况

将样本进行石蜡包埋并切片染色封片后,获得两组 HE 染色实验结果,结果显示 HE 染色与肉眼观测结果基本一致,对照组的颅缝仍有间隙,颅缝维持正常的形态,而旋转组颅缝已闭合(图6)。进一步对切片进行抗体染色并进行 DAB 显色,获得免疫组化结果,在 FAK 免疫组化结果当中,两组颅骨中 FAK 表达量均高于硬脑膜,同时旋转组颅骨中 FAK 表达量明显高于对照组(图7)。Twist1 主要是在硬脑膜中表达量较高,颅骨中几乎少有表达,而且旋转后可以看到 Twist1 被旋转后的颅缝阻挡,不能进入颅缝之间(图8)。

3 讨论

颅骨缝线是胚胎发育过程中逐步形成的,是颅骨扩张的主要部位,硬脑膜与颅骨穹隆上覆组织相互作用并提供了许多重要的生长调节因子、机械信号以及转化迁移的细胞^[6-9]。这一复杂的联级信号受诸多信号通路调控,任一环节的基因突变,均可以导致颅缝早闭或发育异常。

在人类与大鼠的生理学对照中,出生 10 d 的大鼠相当于人类出生 6 个月左右时婴儿的生理状态,此时各颅缝之间未完全闭合,前囟后囟均肉眼可见,颅骨处在发育高峰期,因此选择出生 10 d 的大鼠作为研究对象。

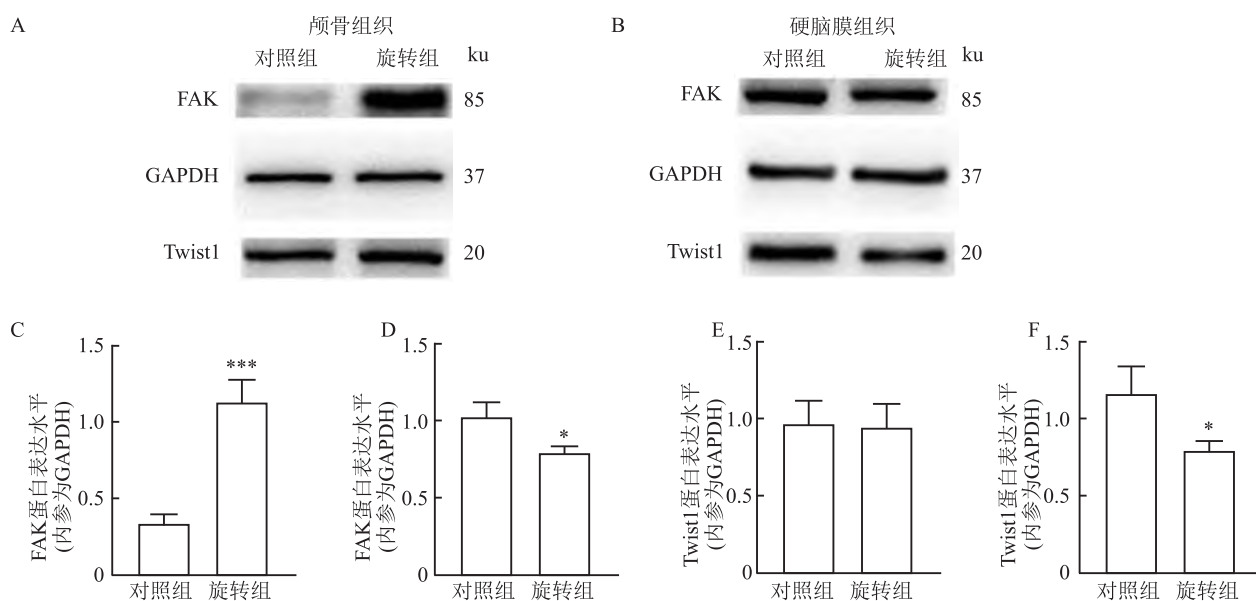


图4 FAK/ Twist1 信号通路分别在旋转组、对照组的硬脑膜和颅骨中蛋白表达情况

A、B:蛋白条带;C:Fak 在两组颅骨中蛋白表达情况;D:Fak 在两组硬脑膜中蛋白表达情况;E:Twist1 在两组颅骨中蛋白表达情况;F:Twist1 在两组硬脑膜中蛋白表达情况;与对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

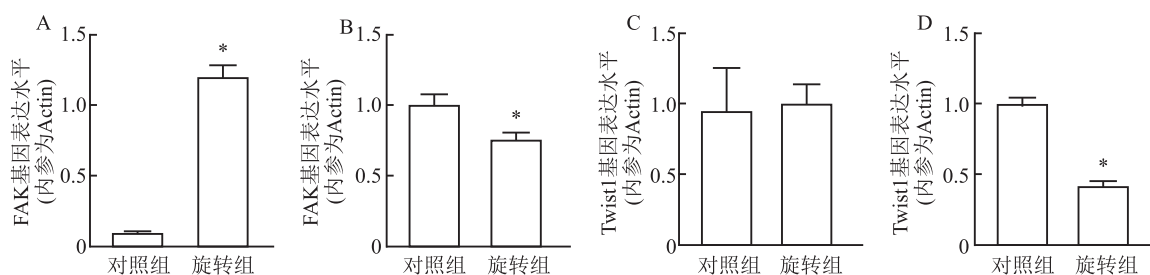


图5 FAK/ Twist1 信号通路分别在旋转组、对照组的硬脑膜和颅骨中 mRNA 表达情况

A:FAK 在两组颅骨中 mRNA 表达情况;B:FAK 在两组硬脑膜中 mRNA 表达情况;C:Twist1 在两组颅骨中 mRNA 表达情况;D:Twist1 在两组硬脑膜中 mRNA 表达情况;与对照组比较: * $P < 0.05$

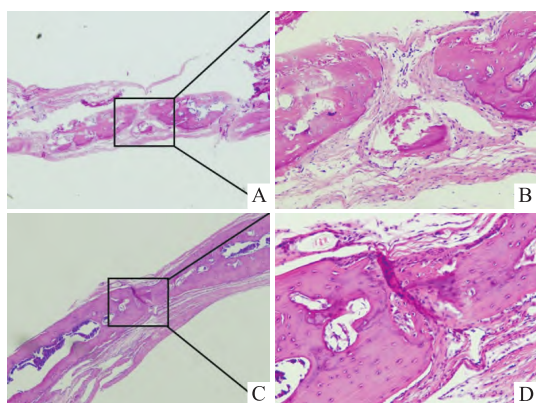


图6 HE 染色

A:对照组 $\times 50$; B:对照组 $\times 200$; C:旋转组 $\times 50$; D:旋转组 $\times 200$

处死两组大鼠获取样本可见:旋转后的颅缝完全闭合,对照组颅缝仍然存在,证明颅缝下硬脑膜是

维持颅缝形态的关键因素。从生理学指标上来看,颅缝早闭往往伴随颅骨形态、发育、头围的异常^[9-10],旋转后的骨瓣厚度大于对照组,其余数据均未见明显差异性,这可能与使用皮尺测量精度稍差有关,也可能因为大鼠生长发育时间较短而不能完全体现出明显差异性。旋转后因为没有 Twist1 等关键因子维持骨缝形态使颅缝逐步闭合,因此旋转后骨瓣较对照组更厚。

在旷场实验中,对照组的总路程、平均速度均大于旋转组,静止时间小于旋转组,由此认为颅缝早闭后可以使大鼠运动能力下降,并且出现抑郁、焦虑倾向。理论上来说,啮齿类动物在进入陌生空间后,其初始活动范围会本能避开中央区域并沿着边缘区域活动,如果大鼠对新环境的认知能力差,则中央格停留时间延长,在四周停留时间减少^[11]。在试验中,

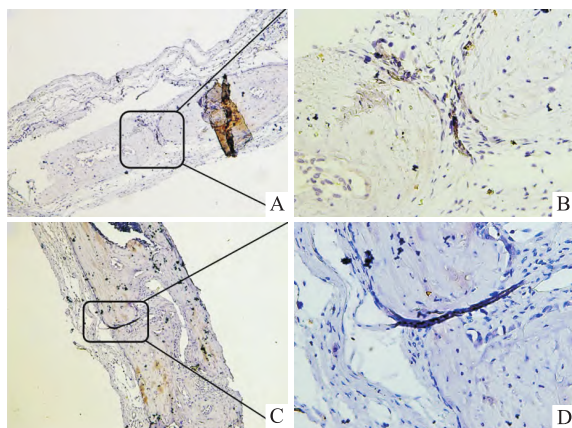


图7 FAK免疫组化结果

A:对照组 FAK 免疫组化 $\times 100$; B:对照组 FAK 免疫组化 $\times 400$; C:旋转组 FAK 免疫组化 $\times 100$; D:旋转组 FAK 免疫组化 $\times 400$; 棕褐色为 FAK 抗体染色阳性

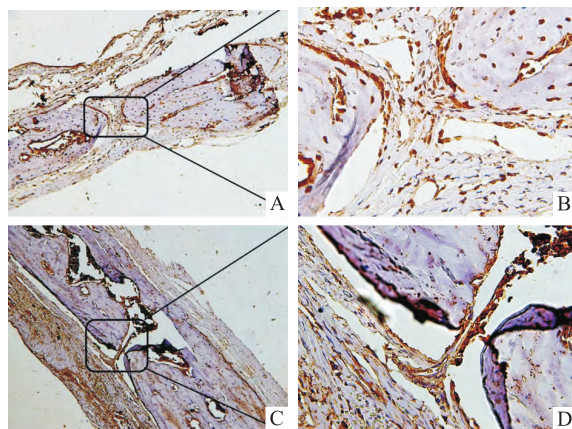


图8 Twist1免疫组化结果

A:对照组 Twist1 免疫组化 $\times 100$; B:对照组 Twist1 免疫组化 $\times 400$; C:旋转组 Twist1 免疫组化 $\times 100$; D:旋转组 Twist1 免疫组化 $\times 400$; 棕褐色为 Twist1 抗体染色阳性

旋转组与对照组在四角的进入次数和持续时间无明显差异性,表明颅缝早闭后对其认知、探索能力无明显影响,四周边角的路程、平均速度和静止时间与总区域中的结果一致,进一步说明颅缝早闭后大鼠运动能力下降且会出现抑郁倾向。由于旷场实验对于抑郁、焦虑等精神异常诊断有限,为了明确颅缝早闭后大鼠是否存在精神异常,还需进行其他行为学测试。

FAK 是将机械现象转化为生化现象必不可少的分子,通过感知压力的变化,控制细胞的黏附、迁移^[12-13],因此,颅内压力的变化是影响 FAK 表达的重要因素。Twist1 主要在相对静止的成体干细胞中表达^[14],并且主要是通过负调控来维持间充质细胞处于未分化状态^[15]。综上所述,在颅缝闭合过程中, Twist1 负责维持颅缝的正常形态,避免颅缝闭合

的同时,使低分化细胞不断增殖分化,产生新的骨细胞。FAK 主要感受压力变化,由于颅内压在随年龄的增长过程中逐步增加,因此 FAK 在持续性的接受机械压力,从而一直发挥由硬脑膜向颅缝迁移粘附细胞的作用。本实验结果也验证了这一点, Twist1 在旋转组硬脑膜中表达量下降的主要原因是当颅缝旋转后,主要位于硬脑膜并负责维持细胞分化状态的 Twist1 的作用受限,无法起到抑制颅缝闭合的作用,从而导致颅缝处细胞逐步由分化程度较低的细胞向分化程度较高,尤其是向成骨细胞逐步转变,最终导致颅缝闭合。旋转组 FAK 无论在颅骨还是硬脑膜中的表达量均明显高于对照组,主要是因为颅缝闭合后颅腔容积相对受限,颅骨的生长不能满足脑的发育,因此会导致颅内压相对增高,而增高的颅内压会刺激 FAK 的持续表达。

影响颅缝闭合的主要因素为缝线下硬脑膜释放的组织因子;颅缝早闭后会导致行动能力下降并出现精神障碍倾向, FAK/Twist1 在颅缝闭合过程中可能发挥着重要的作用,其中 FAK 主要在颅骨中表达,其在颅缝闭合过程中主要作用为:感知压力变化的同时控制细胞迁移, Twist1 主要在硬脑膜及颅缝中央处表达,在颅缝闭合过程中主要起着维持硬脑膜及颅缝处细胞保持低分化状态的作用,当颅缝失去缝线下硬脑膜相关组织因子影响后会导致其提前闭合。

参考文献

- [1] Ogle R C, Tholpady S S, McGlynn K A, et al. Regulation of cranial suture morphogenesis[J]. Cells Tissues Organs, 2004, 176(1-3): 54-66.
- [2] 寇正雄, 张海燕, 张春阳, 等. 硬脑膜对颅骨生长影响的研究进展[J]. 中国医刊, 2021, 56(10): 1059-62.
- [3] el Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, et al. Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome[J]. Nat Genet, 15(1): 42-6.
- [4] Takahashi I, Onodera K, Sasano Y, et al. Effect of stretching on gene expression of beta1 integrin and focal adhesion kinase and on chondrogenesis through cell-extracellular matrix interactions[J]. Eur J Cell Biol, 2003, 82(4): 182-92.
- [5] Kajdic N, Spazzapan P, Velnar T. Craniosynostosis-recognition, clinical characteristics, and treatment[J]. Bosn J Basic Med Sci, 2018, 18(2): 110-6.
- [6] Gong S G. Cranial neural crest: migratory cell behavior and regulatory networks[J]. Exp Cell Res, 2014, 325(2): 90-5.
- [7] Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M, et al. The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities [J]. Schweiz Monatsschr Zahnmed, 2011, 121(7-8): 636-46.

- [8] Twigg S R, Wilkie A O. A genetic-pathophysiological framework for craniosynostosis[J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 97(3): 359 – 77.
- [9] Zhao X, Qu Z, Tickner J, et al. The role of SATB2 in skeletogenesis and human disease[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, 25(1): 35 – 44.
- [10] Sharma R K. Craniosynostosis[J]. *Indian J Plast Surg*, 2013, 46(1): 18 – 27.
- [11] Yadav R S, Chandravanshi L P, Shukla R K, et al. Neuroprotective efficacy of curcumin in arsenic induced cholinergic dysfunctions in rats[J]. *Neurotoxicology*, 2011, 32(6): 760 – 8.
- [12] Lu Y, Sun H. Progress in the development of small molecular inhibitors of focal adhesion kinase (FAK)[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(23): 14382 – 403.
- [13] 杨 扬, 张司玺, 冯士军, 等. 局部黏着斑激酶在骨细胞中的作用[J]. *中国临床医生杂志*, 2020, 48(12): 1404 – 6.
- [14] Qin Q, Xu Y, He T, et al. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 90 – 106.
- [15] Bialek P, Kern B, Yang X, et al. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation[J]. *Dev Cell*, 2004, 6(3): 423 – 35.

The mechanism of FAK/Twist1 signal pathway in the closure of cranial suture

Kou Zhengxiong^{1,2,3}, Zhang Haiyan⁴, Shao Guo^{2,3}, Zhang Xiaolu^{1,2,3}, Zhang Chunyang^{1,2,3}, Hou Xiaofeng^{1,2,3}

[¹Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014000;

²Institute of Neurosurgical Diseases, Baotou Medical College (Translational Medicine), Baotou 014000;

³Inner Mongolia Autonomous Region Bone Tissue Regeneration and Injury Repair Engineering Technology Center, Baotou 014000; ⁴The Third Ward of Neurology, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014000]

Abstract Objective To investigate the function of FAK / Twist1 signaling pathway during craniosynostosis closure. **Methods** Ten days old rats were divided into a control group ($n = 50$) and a rotation group ($n = 50$). Both of them were made a approximately 0.5 cm circle bone window at the midpoint of the lambdoid suture of the rat. The bone flaps were left free without damaging the dura mater. The bone flaps in the control group were repositioned in situ, and the bone flaps in the rotation group were rotated 180° and repositioned 3 weeks later. Then the experiments were performance as followed: open field test, measurement of body weight, head circumference, bone flap area, and thickness of bone flap in the two groups, observation of cranial suture closure by microscopy and HE staining, FAK / Twist1 expression determined by Western blot, real-time PCR, and immunohistochemical staining in the bone flap and dure, respectively. **Results** The cranial sutures was completely closed in the rotation group and that was open in the control group through detecting by microscopic examination and HE staining. The thickness of the bone flap in the derotation group was greater than that in the control group, with statistical significance ($P < 0.01$). There were no significant differences between two groups in head circumference, weight, bone flap area, and operative area. The results of behavioral test showed that after the closure of cranial suture, the action ability of rats decreased and showed a tendency of depression. Compared with that in control group, the expression of FAK was significantly increased in the calvaria and dura as well as Twisit1 was significantly decreased in the dura in rotating group measuring by Western blot, real-time PCR, and immunohistochemical staining ($P < 0.05$). **Conclusion** FAK/Twist1 may play an important role in craniosynostosis after rotation.

Key words FAK; Twist1; closure of cranial suture; craniostenosis; signal pathway; cranial suture rotation