

[文章编号] 1671-587X(2025)06-1445-07

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250601

## 敲低 *KIF3B* 基因通过抑制 Shh 信号通路对小鼠胚胎腭突间充质细胞自噬的促进作用

刘中正<sup>1</sup>, 廉舒博<sup>1</sup>, 冯文宣<sup>2</sup>, 温欣\*, 刘瀚予\*, 何苇<sup>1</sup>

(1. 遵义医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 贵州 遵义 563000; 2. 河南省南阳市口腔医院口腔颌面外科一病区, 河南 南阳 473000)

**[摘要]** **目的:** 探讨敲低小鼠胚胎腭突间充质细胞 (mEPMCs) 初级纤毛 (PC) 重要组件驱动蛋白家族成员 3B (*KIF3B*) 基因对细胞自噬水平的作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 收集体外培养孕龄 14.5 d C57BL/6J 小鼠的 mEPMCs, 根据是否敲低 *KIF3B* 基因和使用平滑因子受体激动剂 (SAG) 激活音猬因子 (Shh) 信号通路及其下游共受体 Smo, 分为对照组 (给予生理盐水)、空载病毒转染细胞组 (sh-NC 组) (给予慢病毒转染)、敲低 *KIF3B* 组 (sh-*KIF3B* 组) (给予 *KIF3B* 基因敲低)、敲低 *KIF3B* 加入 SAG 组 (sh-*KIF3B*+SAG 组) (给予 *KIF3B* 基因敲低后加入 SAG), 每组 5 只大鼠。透射电镜观察各组 mEPMCs 中自噬小体/自噬溶酶体形态表现及数量, Western blotting 法检测各组 mEPMCs 中自噬相关蛋白 苜氯素 1 (Beclin-1) 和 p62 及 Shh 信号通路中 Shh 和 Smo 蛋白表达水平。**结果:** 透射电镜观察, 与对照组比较, sh-*KIF3B* 组 mEPMCs 中自噬小体/自噬溶酶体数量明显增加 ( $P<0.05$ ); 与 sh-*KIF3B* 组比较, sh-*KIF3B*+SAG 组 mEPMCs 中自噬小体/自噬溶酶体数量明显减少 ( $P<0.05$ )。Western blotting 法检测, 与对照组比较, sh-*KIF3B* 组 mEPMCs 中 Beclin-1 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ), *KIF3B*、p62、Shh 和 Smo 蛋白表达水平均明显降低 ( $P<0.01$ ); 与 sh-*KIF3B* 组比较, sh-*KIF3B*+SAG 组 mEPMCs 中 Shh、Smo 和 p62 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ), Beclin-1 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ )。**结论:** 敲低 *KIF3B* 基因可促进 mEPMCs 自噬, 其机制可能与其抑制 Shh 信号通路有关。

**[关键词]** 唇腭裂; 驱幼蛋白家族成员 3B; 初级纤毛; 音猬因子信号通路; 细胞自噬

**[中图分类号]** R782.2 **[文献标志码]** A

## Promotive effect of knockdown of *KIF3B* gene on autophagy in mouse embryonic palatal mesenchymal cells by inhibiting Shh signaling pathway

LIU Zhongzheng<sup>1</sup>, LIAN Shubo<sup>1</sup>, FENG Wenxuan<sup>2</sup>, WEN Xin\*, LIU Hanyu\*, HE Wei<sup>1</sup>

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatology Hospital, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; 2. Ward One, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatology Hospital, Nanyang City, Henan Province, Nanyang 473000, China)

**[收稿日期]** 2023-12-15 **[录用日期]** 2025-03-16

**[基金项目]** 国家自然科学基金地区科学基金项目 (82160176); 贵州省科技厅科技计划项目 (黔科合基础-ZL[2023]一般583); 遵义医科大学省级大学生创新创业项目 (ZYDC2022064)

**[作者简介]** 刘中正 (1995—), 男, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事错颌畸形方面和口腔颌面部畸形方面的研究。

**[通信作者]** 何苇, 教授, 副主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: heweichenhui@163.com)

© 《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effect of knock down of gene of kinesin family member 3B (*KIF3B*), an important component of primary cilia (PC) of in mouse embryonic palatal mesenchymal on the autophagy level of cells (mEPMCs) cells, and to clarify its mechanism. **Methods:** The mEPMCs from gestational day 14.5 C57BL/6J mice cultured in *vitro* were collected and divided into control group (administered normal saline), empty lentivirus transfected cell group (sh-NC group) (administered lentivirus transfection), *KIF3B* knockdown group (sh-*KIF3B* group) (administered *KIF3B* gene knockdown), and *KIF3B* knockdown plus Smoothed receptor agonist (SAG) group (sh-*KIF3B*+SAG group) (administered *KIF3B* gene knockdown followed by SAG addition), based on whether the *KIF3B* gene was knocked down and whether the SAG was used to activate the sonic hedgehog (Shh) signaling pathway and its downstream coreceptor Smo, with 5 rats in each group. Transmission electron microscope was used to observe the morphology and the number of autophagosomes/autolysosomes in the mEPMCs in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of autophagy-related proteins Beclin-1 and p62, and the Shh signaling pathway proteins Shh and Smo in the mEPMCs in various groups. **Results:** The transmission electron microscope observation results showed that compared with control group, the number of autophagosomes/autolysosomes in sh-*KIF3B* group was significantly increased ( $P<0.05$ ); compared with sh-*KIF3B* group, the number of autophagosomes/autolysosomes in the mEPMCs in sh-*KIF3B*+SAG group was significantly decreased ( $P<0.05$ ). The Western blotting results showed that compared with control group, the Beclin-1 protein expression level in the mEPMCs in sh-*KIF3B* group was significantly increased ( $P<0.05$ ), and the *KIF3B*, p62, Shh, and Smo protein expression levels were significantly decreased ( $P<0.01$ ); compared with sh-*KIF3B* group, the Shh, Smo, and p62 protein expression levels in the mEPMCs in sh-*KIF3B*+SAG group were significantly increased ( $P<0.01$ ), and the Beclin-1 protein expression level was significantly decreased ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Knockdown of *KIF3B* gene can promote autophagy of the mEPMCs, and the mechanism may be related to its inhibition of the Shh signaling pathway.

**KEYWORDS** Cleft lip and palate; Kinesin family member 3B; Primary cilia; Sonic hedgehog signaling pathway; Autophagy

唇腭裂(cleft lip and palate, CL/P)是最常见的颌面部畸形之一, CL/P在全世界的发病率约为1/700, 而在中国的发病率可达1.82/1 000<sup>[1-2]</sup>。CL/P病因极其复杂, 目前研究<sup>[3]</sup>认为其致病原因为遗传及环境因素单独或联合共同作用, 但确切的病因尚未完全阐明。由于CL/P对患者身心、家庭乃至整个社会都会造成不良影响, 故探讨其发病机制和预防该疾病发生仍然十分重要。

音猬因子(sonic hedgehog, Shh)信号通路参与了许多组织和器官的发生, 包括四肢、神经系统和牙齿等<sup>[4]</sup>。Shh信号通路的异常调节可能导致多种神经系统疾病和畸形, 如无前脑畸形(holoprosencephaly, HPE)和面中部发育不良, 包括CL/P、扁平鼻并发鼻中隔发育不良, 以及眼眶变形、颌面不对称及基底细胞癌综合征(nevoidbasal cell carcinoma syndrome, NBCCS)等疾病<sup>[4-7]</sup>。已有研究<sup>[8-11]</sup>证实: Shh信号通路不但可以影响小鼠胚胎腭突间充质细胞(mouse embryo

palatal mesenchymal cells, mEPMCs)增殖和凋亡, 而且还能够调控细胞自噬, 同时经典的Shh信号通过细胞上的初级纤毛(primary cilia, PC)传递, 而PC也会影响细胞自噬发生。研究<sup>[13]</sup>证实刺猬因子(hedgehog, Hh)信号通路可以抑制实验用HeLa细胞和肝癌细胞中自噬小体形成, 而在小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)及肾上皮细胞(renal epithelial cell, REC)中的Hh信号通路可以诱导自噬小体形成, 以上相互矛盾的结果或许可以说明在不同类型的细胞中, Hh信号通路与自噬之间的关系不尽相同。因此, mEPMCs自噬水平的改变, 可能会依赖于PC的Shh途径。本研究敲减PC重要组件驱动蛋白家族成员3B(kinesin family member 3B, *KIF3B*)基因后, 检测mEPMCs自噬水平和Shh信号因子表达水平及激活Shh信号后mEPMCs自噬水平的变化, 明确Shh信号对mEPMCs自噬的影响及PC重要组件*KIF3B*的作用, 为小鼠腭部发育机制研究提供

理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、病毒、主要试剂和仪器** 40只SPF级C57BL/6J小鼠(其中30只雌鼠, 10只雄鼠), 购于遵义医科大学实验动物中心[动物使用合格证号: SYXK(黔)2021-0004]。本实验实施过程符合遵义医科大学伦理委员会要求(伦审[2021]2-504号)。慢病毒构建由上海(江西)中洪博元生物技术有限公司负责。平滑因子受体激动剂(smoothened agonist, SAG)购自美国MCE公司, p62、波形蛋白(Vimentin)和细胞角蛋白(pancytokeratin, P-CK)抗体均购自英国Abcam公司, 苜氯素1(Beclin-1)和GAPDH抗体购自美国Proteintech公司, *KIF3B*基因购自美国Santa公司, Shh信号通路下游共受体Smo购自中国ABclona公司, Shh抗体购自美国Affinity公司, 胎牛血清和1%青-链霉素双抗购自美国BI公司, DMEM/F12培养基购自美国Gibco公司。超净工作台购自浙江金净环境技术有限公司, 体式显微镜购自德国Leica公司, 透射电镜JEM-F200购自德国SIMENS公司, 精密电子秤购自日本Tokyo公司, 垂直电泳槽、电泳仪和凝胶成像系统均购自美国Bio-Rad公司。

**1.2 mEPMCs的获取和培养** 按照文献[14]的方法, 给予吸入麻醉后处死全部孕龄14.5 d的孕鼠, 取出胚胎后置于体视显微镜下, 获取胎鼠双侧腭突组织, 用中性蛋白酶处理后4℃的冰箱里过夜消化。次日终止中性蛋白酶消化后低速离心5 min, 弃上清液后加入2 mL含有EDTA的胰蛋白酶(0.25%胰酶)孵育至管内呈浑浊液体, 然后再次离心5 min后弃上清, 加入1 mL培养基后吹打, 计数后转移至T25培养瓶中, 于5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱常规培养。利用P-CK和Vimentin单克隆抗体对同一批次培养的细胞进行鉴定, 显微镜下显示P-CK阴性(细胞无荧光表达), Vimentin阳性(细胞呈绿色荧光), 提示培养的细胞为mEPMCs, 继续培养用于后续实验研究。

**1.3 慢病毒载体的构建、细胞转染和分组** 将*KIF3B*目标序列和空载序列分别整合于质粒载体中, 扩增纯化后进行慢病毒包装, 慢病毒浓缩纯化后分装后-80℃保存备用。*KIF3B*目标序列CCTGTCTCTGCTGTGG GATACAAGA, 空载序列TTCTCCGAACGTGTCACG TAA; *KIF3B*

沉默序列: R 5'-GATCCGCCTGTCTCTGCTG-TGGGATACAAGACTCGAGTCTTGTATCCCA-CAGCAGAGACAGGTTTTTTT-3', F 5'-AATT-CAAAAAACCTGTCTCTGCTGTGGGATACA-AGACTCGAGTCTTGTATCCCACAGCAGAG-ACAGGCG-3'; 空载序列: R 5'-GATCCGTTCT-CCGAACGIGTCACGTAATTCAAGAGATTAC-GIGACACGTTTCGGAGAATTTTTTTC-3', F 5'-AATTGAAAAAATTCTCCGAACGIGICACGTAA-TCTCTTGAATTACGIGACACGTTTCGGAGAA-CG-3'。采用相应序列慢病毒进行细胞转染, 筛选出聚凝胺最佳浓度=5 mg·L<sup>-1</sup>, 感染复数(multiplicity of infection, MOI)=50。选取状态最佳的细胞, 以5×10<sup>5</sup>个的密度接种至T25细胞培养瓶内, 加入所需体积的病毒液及助转剂, 于细胞孵箱内继续培养转染细胞, 48~72 h后细胞呈现明亮绿色荧光且荧光强度约占视野下80%时, 视为转染成功, 继续扩大培养以用于后续实验。

为验证mEPMCs自噬水平提高是否发生在沉默*KIF3B*基因后, 将小鼠的mEPMCs按照不加入药物给予生理盐水、给予慢病毒转染、敲低*KIF3B*和敲低*KIF3B*后加入SAG, 分为对照组、空载病毒转染细胞组(sh-NC组)、敲低*KIF3B*组(sh-*KIF3B*组)、敲低*KIF3B*加入SAG组(sh-*KIF3B*+SAG组), 每组5只大鼠。

**1.4 透射电镜观察各组mEPMCs中自噬小体/自噬溶酶体形态表现和数量** 慢病毒转染后的各组细胞根据分组给予不同干预后再培养24 h, 然后将细胞置于2%戊二醛中, 在4℃条件下固定约3 h, 然后磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗后用1%锇酸固定, 随后梯度乙醇脱水、包埋、切片, 铀铅双染色透射电镜观察摄片。透射电镜下可见自噬小体/自噬溶酶体, 内含线粒体及内质网碎片, 且包浆成分尚在的双层或多层膜结构为自噬小体; 内源性物质的囊泡融合或细胞质已遭到吞噬, 包浆成分已降解的单层膜结构为自噬溶酶体<sup>[15]</sup>。自噬小体/自噬溶酶体出现在自噬发生的中到晚期, 二者均可代表自噬发生。采用高分辨率透射电镜进行拍摄, 5 000~20 000倍镜下选择清晰可见为多层或单层膜样的自噬结构进行细胞计数。

**1.5 Western blotting法检测各组mEPMCs中Shh信号通路及自噬蛋白表达水平** 将慢病毒转染后的各组细胞根据分组给予不同干预措施后再培养

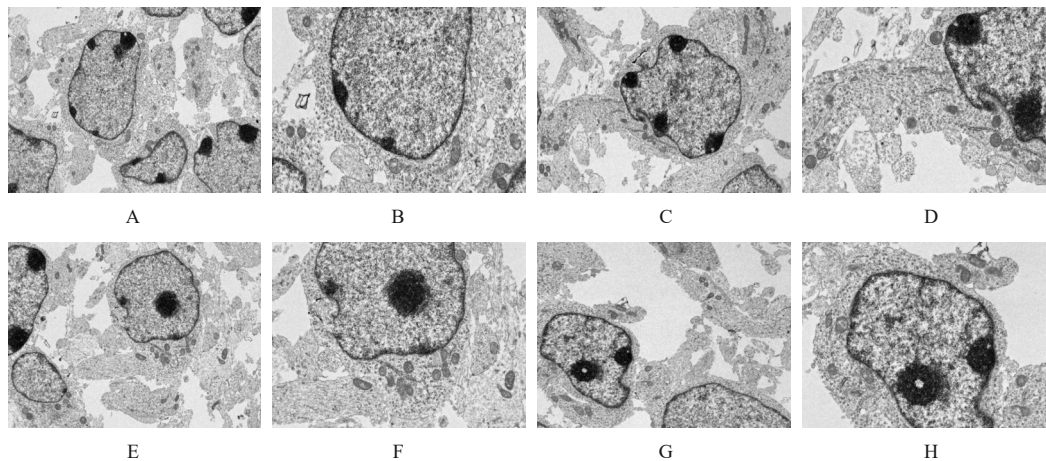
24 h, 然后提取各组细胞总蛋白, BCA法检测各组蛋白浓度, 并调整各组蛋白浓度为  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 加入适量  $5\times\text{SDS}$  上样缓冲液后,  $100\text{ }^\circ\text{C}$  水浴 10 min 变性蛋白, 将各组蛋白样品上样到配置好的电泳凝胶后进行电泳、转膜、各目的蛋白一抗  $4\text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜, KIF3B (1:1 000)、Beclin-1 (1:5 000)、p62 (1:5 000)、GADPH (1:5 000)、Shh (1:1 000) 和 Smo (1:1 000), 二抗室温孵育 1 h, TBST 溶液洗涤后用 ECL 显色。采用 Image J 软件检测蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

**1.6 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。各组小鼠 mEPMCs 中自噬小体/自噬溶酶体数量及 KIF3B、Shh、Smo、Beclin-1 和 p62 蛋白

表达水平符合正态分布, 以  $\bar{x}\pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组 mEPMCs 中自噬小体/自噬溶酶体形态表现和数量** 各组细胞在电镜下均可见双层或单层膜样结构的自噬小体及自噬溶酶体。与对照组比较, sh-NC 组 mEPMCs 中自噬小体/自噬溶酶体数量差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), sh-KIF3B 组 mEPMCs 中自噬小体/自噬溶酶体数量明显增加 ( $P<0.05$ )。与 sh-KIF3B 组比较, sh-KIF3B+SAG 组 mEPMCs 中自噬小体/自噬溶酶体数量明显减少 ( $P<0.05$ )。见图 1 和表 1。



A, E: Control group; B, F: Sh-NC group; C, G: Sh-KIF3B group; D, H: Sh-KIF3B+SAG group. A-D:  $\times 6800$ ; E-H:  $\times 18500$ .

图 1 透射电镜下观察各组 mEPMCs 中自噬小体/自噬溶酶体形态表现

Fig. 1 Morphology of autophagosome/ autophagolysosome in mEPMCs in various groups observed under transmission electron microscope

表 1 各组 mEPMCs 中自噬体/自噬溶酶体数量

Tab. 1 Numbers of autophagosomes/autophagolysosomes in mEPMCs in various groups ( $n=6, \bar{x}\pm s$ )

Group	Number
Control	$6.21\pm 0.81$
Sh-NC	$6.84\pm 0.32$
Sh-KIF3B	$17.93\pm 0.64^*$
Sh-KIF3B+SAG	$6.47\pm 0.57^\Delta$

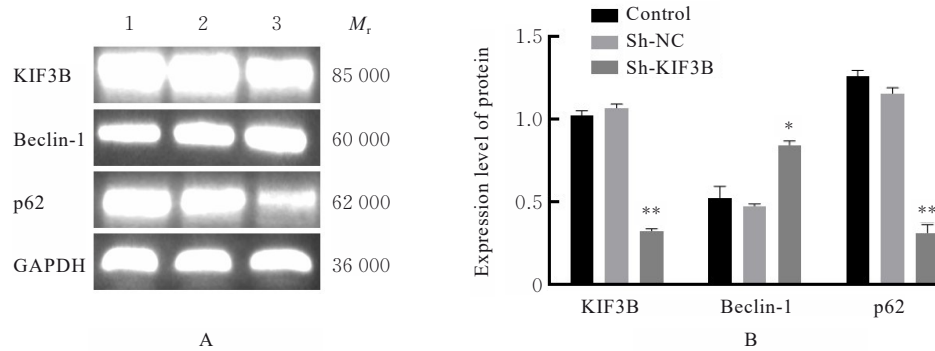
\* $P<0.05$  vs control group;  $^\Delta P<0.05$  vs sh-KIF3B group.

**2.2 各组 mEPMCs 中 KIF3B、Beclin-1、p62、Shh 和 Smo 蛋白表达水平** 与对照组比较, sh-NC 组

mEPMCs 中 KIF3B、Beclin-1、p62、Shh 和 Smo 蛋白表达水平差异无统计学意义 ( $P<0.05$ ), sh-KIF3B 组 mEPMCs 中 Beclin-1 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ), KIF3B、p62、Shh 和 Smo 蛋白表达水平均明显降低 ( $P<0.01$ )。见图 2 和 3。与 sh-KIF3B 组比较, sh-KIF3B+SAG 组 mEPMCs 中 Shh、Smo 和 p62 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ), Beclin-1 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ )。见图 4。

## 3 讨论

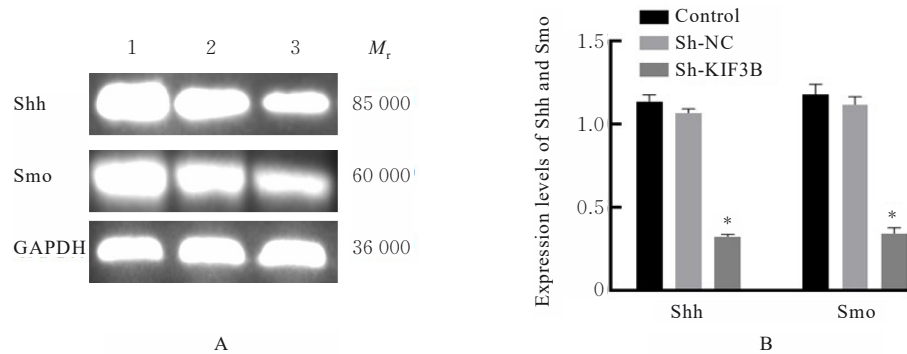
本课题组在前期研究<sup>[16]</sup>发现: PC 存在 mEPMCs 中。通过干扰 PC 中转运系统内关键蛋白



Lane 1: Control group; Lane 2: Sh-NC group; Lane 3: Sh-KIF3B group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图2 Western blotting法检测各组 mEPMCs 中 KIF3B 及自噬相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

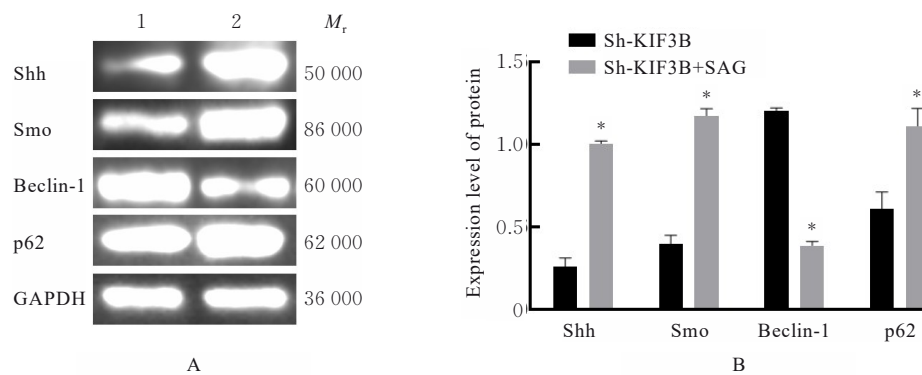
Fig. 2 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of KIF3B and autophagy-related proteins in mEPMCs in various groups detected by Western blotting method



Lane 1: Control group; Lane 2: Sh-NC group; Lane 3: Sh-KIF3B group. \* $P < 0.01$  compared with control group.

图3 Western blotting法检测各组 mEPMCs 中 Shh 信号通路蛋白 Shh 和 Smo 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 3 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of Shh signaling pathway proteins Shh and Smo proteins in mEPMCs in various groups detected by Western blotting method



Lane 1: Sh-KIF3B group; Lane 2: Sh-KIF3B+SAG group. \* $P < 0.01$  compared with sh-KIF3B group.

图4 Western blotting法检测2组 mEPMCs 中 Shh 信号通路蛋白及自噬相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 4 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of Shh signaling pathway proteins and autophagy-related proteins in mEPMCs in two groups detected by Western blotting method

纤毛内的转运系统 122 (intraflagella transport, IFT122) 后, 可以导致 PC 的生长缺陷与功能受损, 影响细胞增殖, 最终导致口面部出现裂隙<sup>[17]</sup>。

*KIF3B* 在 PC 转运系统中承担着协助细胞内转运蛋白复合体顺向转运蛋白的重要工作, 对 PC 形成、发生及定位于 PC 的信号通路传递至关重要<sup>[17-18]</sup>。

本研究结果显示:与对照组比较,sh-KIF3B组mEPMCs中自噬小体/自噬溶酶体数量明显增加,Beclin-1蛋白表达水平明显升高和p62等自噬相关蛋白表达水平明显降低,证实敲低KIF3B基因后mEPMCs将出现自噬水平升高的情况。

Shh信号通路的传递受到干扰后,mEPMCs增殖水平产生一定变化<sup>[13, 19]</sup>,这是因为对细胞生长发育中起到重要作用的Shh信号通路中的大部分组件都定位在PC上。Shh信号通路主要是由其相应配体Shh、跨膜受体(Patched, Ptch)、共受体Smo和转录因子(Gli)家族组成<sup>[21]</sup>。Shh信号通路正常情况下,即无细胞外配体Shh存在时,细胞膜上的Ptch1受体与Smo结合,以抑制Smo向下游传递信号。当Shh出现时,Ptch1与Shh结合,使Smo得以释放至PC上,激活下游细胞转录因子Gli家族进入细胞核中,调控细胞周期蛋白Cyclin家族,促进细胞进入细胞周期、促进增殖<sup>[22]</sup>。本研究结果显示:与对照组比较,sh-KIF3B组mEPMCs中Shh和Smo蛋白表达水平明显降低,进一步说明敲低KIF3B基因后,PC功能受损对Shh信号通路产生了抑制作用。

目前已有文献<sup>[23]</sup>报道:Shh信号通路在哺乳动物腭部发育中,在调节胚胎腭突上皮-间质转化和细胞凋亡的活动中起直接或间接作用,但mEPMCs的PC因KIF3B受损是否会阻碍Shh信号通路传导,进而影响细胞自噬尚不清楚。本研究结果显示:sh-KIF3B组mEPMCs在敲低KIF3B基因后出现大量的自噬小体/自噬溶酶体,表明纤毛功能受损促进了mEPMCs自噬;Shh信号通路中关键蛋白Smo的激动剂SAG干预后,sh-KIF3B+SAG组mEPMCs的自噬小体/自噬溶酶体数量明显减少,表明在激活Shh下游信号因子后,mEPMCs的自噬水平得到了一定程度恢复,但未能完全恢复,提示敲低KIF3B基因促进mEPMCs自噬是通过抑制Shh信号通路得以实现。

除Shh的经典通路外,Shh信号通路的非典型传导的3种不同的亚型:①单独激活Hh,不依赖Gli行使功能,其也可细分为Smo依赖型和Smo非依赖型;②诱导Gli活性的替代机制;③绕过Shh-Ptch-Smo途径,对Gli进行异常活化,例如丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、酸肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase,

mammalian target of rapamycin, mTOR)、转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )等信号通路,能够让Gli被直接转录活化<sup>[24-25]</sup>,也表明Shh的传导与其他信号通路联系紧密。YAO等<sup>[13]</sup>研究发现:在小鼠肝脏细胞中,Hh通路经Smo活化-磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)依赖的AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK),促进AML12细胞自噬。研究<sup>[26]</sup>表明:Shh可不依赖于mTOR信号途径,直接活化AKT调控人和动物的血管生成。由于自噬在多种细胞中的不同表现,且存在着多种可以与Shh信号通路相互作用的其他通路,因此在mEPMCs中,细胞自噬-Shh信号通路-PC之间的关系仍有待深入研究。

综上所述,mEPMCs中KIF3B基因缺失会抑制Shh信号通路,激活mEPMCs自噬,通过SAG对Shh下游信号的激活,可以部分恢复被抑制的Shh信号通路,并且同时也降低mEPMCs的自噬水平。mEPMCs中PC与细胞自噬之间的直接关系及Shh信号非典型传导通路与细胞自噬之间的相互关系有待进一步研究。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

刘中正和廉舒博参与文献检索、实验设计及论文撰写,冯文宣参与数据收集和分析,温欣和刘瀚予参与论文结果分析及讨论,何苇参与论文写作指导和审核。

#### 参考文献

- [1] MOSSEY P A, LITTLE J, MUNGER R G, et al. Cleft lip and palate[J]. Lancet, 2009, 374(9703): 1773-1785.
- [2] XU D P, QU W D, SUN C, et al. A study on environmental factors for nonsyndromic cleft lip and/or palate[J]. J Craniofac Surg, 2018, 29(2): 364-367.
- [3] NASREDDINE G, HAJJ J E L, GHASSIB-SABBAGH M. Orofacial clefts embryology, classification, epidemiology, and genetics[J]. Mutat Res Rev Mutat Res, 2021, 787: 108373.
- [4] NASRALLAH I, GOLDEN J A. Brain, eye, and face defects as a result of ectopic localization of Sonic hedgehog protein in the developing rostral neural tube[J]. Teratology, 2001, 64(2): 107-113.
- [5] PRAJAPATI A, MEHAN S, KHAN Z. The role of

- Smo-Shh/Gli signaling activation in the prevention of neurological and ageing disorders [J]. *Biogerontology*, 2023, 24(4): 493-531.
- [6] BEAR K A, SOLOMON B D, ANTONINI S, et al. Pathogenic mutations in *GLI2* cause a specific phenotype that is distinct from holoprosencephaly [J]. *J Med Genet*, 2014, 51(6): 413-418.
- [7] XIANG Y, LI X L, ZHAN Z Y, et al. A novel nonsense *GLI3* variant is associated with polydactyly and syndactyly in a family by blocking the sonic hedgehog signaling pathway [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 542004.
- [8] HOYOS CADAVID A M, KAMINAGAKURA E, RODRIGUES M F S D, et al. Immunohistochemical evaluation of Sonic Hedgehog signaling pathway proteins (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, and Gli3) in sporadic and syndromic odontogenic keratocysts [J]. *Clin Oral Investig*, 2019, 23(1): 153-159.
- [9] 陈珏蓉, 陈菁菁, 刘 觅, 等. 地塞米松和维生素B<sub>12</sub>干预下小鼠胚胎腭突Shh相关信号因子的研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2021, 46(12): 1454-1459.
- [10] MAHARJAN Y, LEE J N, KWAK S, et al. Autophagy alteration prevents primary cilium disassembly in RPE1 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(2): 242-248.
- [11] ZHANG S K, LIU Y Y, LIANG Q W. Low-dose dexamethasone affects osteoblast viability by inducing autophagy *via* intracellular ROS [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4307-4316.
- [12] LI H J, LI J J, LI Y N, et al. Sonic hedgehog promotes autophagy of vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(11): H1319-H1331.
- [13] YAO Y X, LI T Y, YU T T, et al. Hedgehog signal activates AMPK *via* Smoothened to promote autophagy and lipid degradation in hepatocytes [J]. *Biochem Cell Biol*, 2023, 101(4): 284-293.
- [14] 郭佳男. IFT122通过初级纤毛介导的Shh信号通路调控mEPMCs增殖的机制研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.
- [15] 武春艳, 杨 意, 杨 霞, 等. 自噬小体的生物发生和成熟 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2024, 46(1): 118-128.
- [16] 陈珏蓉, 王 新, 陈 尚, 等. 小鼠胚胎腭突上皮细胞初级纤毛生长规律的研究 [J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(9): 914-918.
- [17] JI Y, GARLAND M A, SUN B, et al. Cellular and developmental basis of orofacial clefts [J]. *Birth Defects Res*, 2020, 112(19): 1558-1587.
- [18] BALDARI C T, ROSENBAUM J. Intraflagellar transport: it's not just for cilia anymore [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(1): 75-80.
- [19] FUNABASHI T, KATOH Y, OKAZAKI M, et al. Interaction of heterotrimeric kinesin- II with IFT-B-connecting tetramer is crucial for ciliogenesis [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(8): 2867-2876.
- [20] 殷 杰. 小鼠胚胎腭间充质细胞中Smo蛋白在初级纤毛的定位研究 [D]. 遵义: 遵义医学院, 2017.
- [21] LIU A M. Proteostasis in the hedgehog signaling pathway [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 93: 153-163.
- [22] CARBALLO G B, HONORATO J R, DE LOPES G P F, et al. A highlight on Sonic hedgehog pathway [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 11.
- [23] WANG Q, KUROSAKA H, KIKUCHI M, et al. Perturbed development of cranial neural crest cells in association with reduced sonic hedgehog signaling underlies the pathogenesis of retinoic-acid-induced cleft palate [J]. *Dis Model Mech*, 2019, 12(10): dmm040279.
- [24] PIETROBONO S, GAGLIARDI S, STECCA B. Non-canonical hedgehog signaling pathway in cancer: activation of GLI transcription factors beyond smoothened [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 556.
- [25] WANG W C, SHIRAISHI R, KAWAUCHI D. Sonic hedgehog signaling in cerebellar development and cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 864035.
- [26] SENATORE E, IANNUCCI R, CHIUSO F, et al. Pathophysiology of primary cilia: signaling and proteostasis regulation [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 833086.

\* 遵义医科大学口腔医学院2019级口腔医学专业