论著

文章编号:1000-5404(2013)18-1932-04

细胞外信号调控激酶在邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯诱导的尿道下裂大鼠中的表达

王 强,李明勇,刘东尧,温 晟,龙春兰,魏光辉 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地)

[摘要] **目的** 在邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯[di-(2-ethylhexyl) phthalate,DEHP]诱导的先天性尿道下裂大鼠模型上,研究细胞外信号调控激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)1/2 在 DEHP 暴露后的胎鼠阴茎中的表达变化,探讨尿道下裂发生机制。**方法** 将 SD 孕鼠完全随机分为 DEHP 组[750 mg/(kg·d) DEHP + 1.5 mL 大豆油]和对照组(1.5 mL 大豆油),每组 20 只,2 组分别于母鼠怀孕天数(GD)第 12~19 天持续经口灌注给药。2 组分别取 10 只孕鼠让其正常分娩,并计数每窝产雄性活仔鼠数量;出生后 1、3、7、14、21、30 日龄时称取雄性仔鼠体质量并测量肛门生殖器距离(anogenital distance,AGD);30 日龄时逐个检查尿道下裂的发生情况。余孕鼠在 GD20 行剖宫产取雄性胎鼠,应用实时定量聚合酶链反应(qPCR)和免疫组化方法分别检测胎鼠阴茎组织中 ERK1/2 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** DEHP 组孕期暴露诱导的尿道下裂发生率为 28.2%。DEHP 组每窝产雄性活仔鼠数量、各日龄雄性仔鼠体质量及 AGD 较对照组明显减少或缩短($P<0.01$)。与对照组比较,DEHP 组胎鼠阴茎组织中 ERK1 和 ERK2 mRNA 表达水平明显增加($P<0.05$);DEHP 组 ERK1/2 磷酸化蛋白表达水平有增加趋势。**结论** DEHP 诱导先天性尿道下裂发生可能与胎鼠阴茎组织中 ERK 信号的过度表达有关。

[关键词] 尿道下裂;细胞外信号调控激酶;邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯;丝裂原活化蛋白激酶;大鼠
[中图法分类号] R345;R363.21;R696.02 [文献标志码] A

Expression of extracellular signal-regulated kinase in hypospadiac penis of fetal rats induced by maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate

Wang Qiang, Li Mingyong, Liu Dongyao, Wen Shen, Long Chunlan, Wei Guanghui (Department of Pediatric Urology Surgery, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Copperation Center For Child Development and Disorders, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in the hypospadiac penis of fetal rats induced by maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in order to explore the etiology of hypospadias. **Methods** Forty timed-pregnant rats were randomly divided into 2 groups, control and DEHP induction group. The rats of the former group were given soybean oil, while those of later group were given gastric intubation of 750 mg/kg DEHP dissolved in soybean oil from gestation day (GD) 12 to 19. In each group, half of them (10 rats) were raised to deliver naturally, and live male pups were counted. The male pups' weight and their anogenital distance (AGD) were measured on postnatal day (PND) 1, 3, 7, 14, 21 and 30, and the hypospadias was observed on PND 30. The left (10 rats) were caesarean delivered at GD 20, and fetal rats penis were collected for real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and immunochemical assay to determine the mRNA expression and protein phosphorylation level of ERK1/2. **Results** The hypospadias incidence of DEHP group was 28.2%. Compared with normal control group, the decreased numbers of live male pups, body weight and AGD on PND 1, 3, 7, 14, 21 and 30 were observed. The mRNA expression of ERK1 and ERK2 in the fetal rat penis of DEHP group was increased significantly ($P<0.05$). And the protein phosphorylation levels of ERK1/2 in DEHP group also showed an increa-

[基金项目] 国家自然科学基金(81070475,81100415);重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5377)
[通信作者] 魏光辉,E-mail:ghwei@cqmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130701.0925.008.html(2013-07-01)

sing trend. **Conclusion** DEHP-induced hypospadias might be due to the over-expression of ERK1/2 in the fetal rat penis.

[**Key words**] hypospadias; extracellular signal-regulated kinase; di-(2-ethylhexyl) phthalate; mitogen activated protein kinase; rats

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81070475, 81100415) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5377). Corresponding author: Wei Guanghui, E-mail: ghwei@cqmu.edu.cn

尿道下裂是一种常见的泌尿外生殖器畸形,主要表现为尿道的发育缺陷和包皮的环状闭合障碍,致使尿道开口异位于阴茎腹侧,甚至阴囊和会阴区。在不同种族,新生儿发病率为1/(200~300),并呈逐年上升趋势[1]。然而其病因仍然未知。邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯[di-(2-ethylhexyl) phthalate,DEHP]是一种塑化剂,也是一种白色污染源,大量研究[2-4]认为DEHP具有环境内分泌干扰作用,是一种重要的人工合成的环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors,EEDs),能诱导先天性尿道下裂发生。Ross等[5]通过对尿道下裂大鼠全基因组芯片分析,发现差异性表达最丰富的区域主要为丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPK)成员。细胞外信号调控激酶(ERK)正是MAPK成员中非常重要的一员,它由ERK1和ERK2两种亚型组成,是许多细胞应激过程中重要的信号调控通路,包括凋亡、应激反应、生长、增殖和分化等。但是,ERK在正常和畸形阴茎形成过程中的作用仍不清楚。本研究将在DEHP诱导尿道下裂大鼠模型的基础上,初步探索ERK在DEHP暴露后实验组胎鼠阴茎中的表达变化,为进一步阐明尿道下裂发生机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠,约10周龄,雌性40只,体质量(250±10)g,雄性10只,体质量(320±10)g,购自重庆医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(渝)2007-0001]。饲养于重庆医科大学附属儿童医院SPF实验动物中心[SYXK(渝)2007-0016]。孕期计算以雌、雄大鼠按1:1比例合笼后,每天上午固定时间检查笼底有无精液栓,发现精液栓的当天确定为孕0 d(gestation day 0,GD0)。本研究遵从国际实验动物护理和使用指南。

1.2 主要试剂及仪器

DEHP(分析纯,浓度>99%)由上海化学试剂有限公司生产;精制大豆油购自金龙鱼,上海益海嘉里食品营销有限公司;游标卡尺(0~150 mm,上海恒胜工具有限公司);兔二步法检测试剂盒(含3% H_2O_2 液)和DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);封闭用正常山羊血清工作液(北京康为世纪生物科技有限公司);兔抗Anti-ERK1/2多克隆抗体(bs-2637R,北京博奥森生物科技有限公司)和兔抗phospho-p44/42 MAPK(ERK1/2)单克隆抗体(#4370,美国CST公司),Prime script RT试剂盒(大连TaKaRa生物科技有限公司),高纯总RNA快速提取试剂盒和2×SYBR Real-time PCR Premixture(北京百泰克生物科技有限公司)。

1.3 动物分组及给药

将GD12的40只健康孕鼠完全随机分为2组:DEHP组和对照组,每组20只。DEHP组将750 mg/(kg·d)DEHP溶于1.5 mL大豆油中灌胃;对照组以1.5 mL大豆油灌胃,GD12~19连续每天定时灌胃1次。各组分别取10只孕鼠正常分娩。

1.4 尿道下裂形态学观察

仔鼠出生后,分别计数每窝产雄性活仔数;雄性仔鼠出生后(PND)第1、3、7、14、21、30天,称取体质量和测量肛门生殖器距离(anogenital distance,AGD);PND30时逐个检查雄鼠的阴茎弯曲度、尿道开口部位,判断有无尿道下裂[2]。

1.5 组织标本的制备

其余孕鼠在GD 20,经10%水合氯醛腹腔注射麻醉(4 mL/kg),行破宫产取出胎鼠,以有无睾丸或子宫判断胎鼠性别,从每窝胎鼠的阴茎组织中取1个用4%多聚甲醛溶液固定48 h,其余立即置液氮中冻存。

1.6 胎鼠阴茎组织中ERK1和ERK2 mRNA表达的检测

采用实时定量聚合酶链反应(qPCR)法。从液氮中取出新鲜胎鼠阴茎组织,按试剂盒说明书提取总RNA,在紫外分光光度仪上于260 nm波长下检测浓度。按照逆转录试剂盒说明书固定地每20 μL体系将0.9 μg总RNA逆转录成为cDNA。采用Primer 5.0设计合成引物。ERK1上游引物:5′-GACCTGAAGCCCTCCAATC-3′,下游引物:5′-GCCACATACTCGGTCAGAAA-3′,预计产物122 bp,最适退火温度58.5 ℃;ERK2上游引物:5′-CCCAAACGCTGACTCCAA-3′,下游引物:5′-AGAGCCTGTTCAACTTCAATCC-3′,预计产物87 bp,最适退火温度58.5 ℃;内参GAPDH上游引物:5′-GCCAGCCTCGTCTCATAGACA-3′,下游引物:5′-TGGTAACCAGGCGTCCGATA-3′,预计产物75 bp。qPCR反应体系和反应程序参照SYBR说明书设定。通过优化反应条件,调整反应体系,建立稳定、高重复性的标准曲线;参照内参GAPDH的表达进行相对定量分析($2^{-\triangle\triangle Ct}$),计算出ERK1/2 mRNA在各组包皮组织中的相对表达量。每个cDNA样本重复3次。

1.7 胎鼠阴茎组织中总ERK(T-ERK)和磷酸化ERK(p-ERK)蛋白表达的检测

采用免疫组化法。将固定好的阴茎组织常规脱水、浸蜡、包埋,5 μm连续横切面切片黏附在防脱载玻片上,60 ℃恒温干燥箱中烘烤过夜(>12 h);再经脱蜡、水化后,0.01 mol/L枸橼酸盐溶液微波抗原热修复15 min,自然冷却至室温;3%

H_2O_2 液和山羊血清先后于室温封闭 15 min;甩去多余封闭液,加入 ERK1/2 多抗(1∶80 稀释)、p-ERK(1∶400 稀释),湿盒中 4 ℃ 过夜;滴加兔二步法检测试剂,37 ℃ 30 min;DAB 显色,苏木精染核 30 s,晾干,中性树胶封片。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用完全随机设计两样本均数的 t 检验。

2 结果

2.1 2组孕鼠雄性仔鼠生殖参数和尿道下裂发生情况

DEHP 组 10 只孕鼠共产仔 82 只,其中雄性 39 只,发生尿道下裂 11 只,发生率约为 28.2%;对照组 10 只孕鼠共产仔 119 只,其中雄性 62 只,无尿道下裂发生。与对照组比较,DEHP 组每窝产雄性活仔数、各日龄雄性仔鼠的体质量、AGD 值及 AGD/体质量比值均有明显减少或缩短($P<0.05$),见表 1。DEHP 组共有 11 只雄鼠发生尿道下裂畸形,尿道下裂畸形发生率与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

表 1 2组孕鼠雄性仔鼠各日龄体质量及 AGD 值比较

组别	n	体质量(g)	AGD(mm)	AGD/体质量(mm/g)
对照组	62			
PND1		6.95±0.14	4.67±0.20	0.673±0.039
PND3		9.98±0.29	6.02±0.27	0.603±0.013
PND7		18.78±0.23	8.43±0.46	0.449±0.019
PND14		32.98±0.69	12.05±0.40	0.365±0.011
PND21		52.33±1.39	18.16±0.73	0.347±0.015
PND30		84.82±7.56	23.73±1.09	0.281±0.014
DEHP 组	39			
PND1		6.32±0.60[a]	3.91±0.57[a]	0.596±0.039[b]
PND3		8.11±0.95[a]	5.42±0.67[a]	0.546±0.036[a]
PND7		14.02±2.39[a]	6.76±0.73[a]	0.386±0.051[a]
PND14		27.03±3.01[a]	10.20±0.80[a]	0.322±0.036[a]
PND21		42.48±4.61[a]	15.14±1.17[a]	0.313±0.034[a]
PND30		66.08±8.67[a]	20.88±1.36[a]	0.262±0.013[a]

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

表 2 2组孕鼠雄性仔鼠数和尿道下裂发生情况($n=10$)

组别	每窝产雄性活仔数(只)	雄性仔鼠尿道下裂发生数(只)	雄性仔鼠尿道下裂发生率(%)
对照组	6.2±1.5	0	0
DEHP 组	3.9±1.6[a]	11	28.2[a]

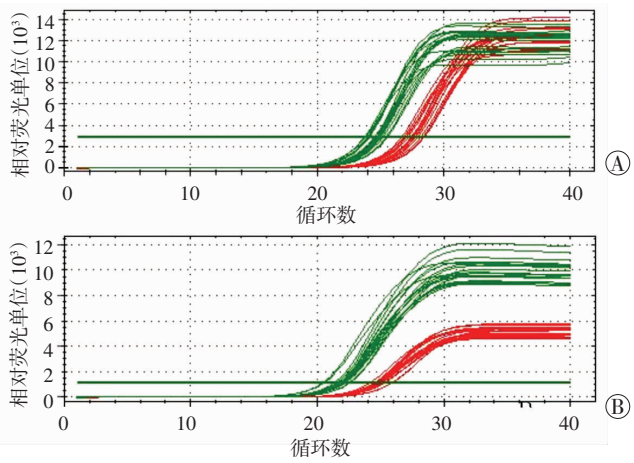
a:$P<0.01$,与对照组比较

2.2 胎鼠阴茎组织中 ERK1 和 ERK2 mRNA 的表达

qPCR 检测结果显示:ERK1 和 ERK2 mRNA 在对照组表达分别是(0.82±0.13)和(1.32±0.33),在 DEHP 组分别是(1.09±0.18)和(1.81±0.22),与对照组比较,DEHP 组的 ERK1 和 ERK2 mRNA 表达水平均显著增高($P<0.05$)。荧光扩增曲线见图 1。

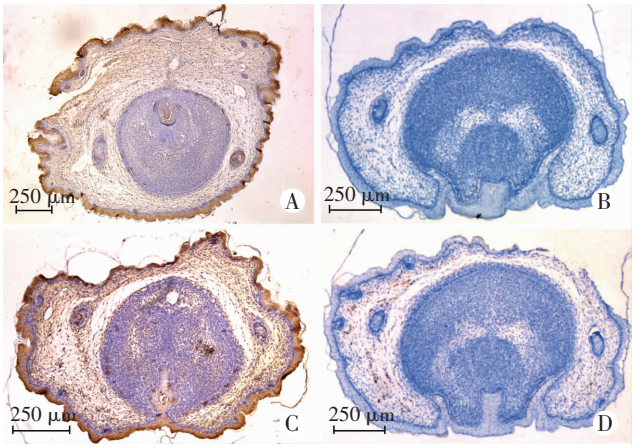
2.3 胎鼠阴茎组织中总 ERK(T-ERK)和磷酸化 ERK(p-ERK)蛋白的表达

免疫组织化学检测结果显示:T-ERK 和 p-ERK 蛋白主要分布于阴茎包皮皮下和尿道周围的海绵体,呈棕黄色示阳性表达,p-ERK 在 DEHP 组胎鼠阴茎组织中的表达丰富,而在对照组阴茎组织中无表达。T-ERK 蛋白水平在两者之间的表达未见明显差异,见图 2。



A:ERK1;B:ERK2

图 1 胎鼠生殖结节组织中 ERK1 和 ERK2 mRNA 的 qPCR 扩增曲线



A:对照组 T-ERK 表达;B 对照组 p-ERK 表达;C:DEHP 组 T-ERK 表达;D:EHP 组 p-ERK 表达

图 2 T-ERK 和 p-ERK 在胎鼠阴茎组织中的表达 (PV 两步法)

3 讨论

本研究参照以往研究结果[2-3],选择适宜的诱导剂量 DEHP[750 mg/(kg·d)]成功诱导出先天性尿道下裂大鼠模型。进一步分别从 mRNA 和蛋白质及其磷酸化修饰水平上初步观察到 ERK1/2 mRNA 和 ERK1/2 蛋白磷酸化水平在 DEHP 组大鼠阴茎中表达较对照组有显著增强。关于 ERK 功能的研究多集中在肾脏疾病、肿瘤和应激反应及损伤修复等发生过程的调控。有关 ERK 过表达与人类先天性泌尿生殖畸形相关性尚不清楚。因此,通过对已知 ERK 的功能来推测和解释 ERK 过表达与尿道下裂之间关系显得很有必要。

DEHP 是一种重要的 EEDs,有研究[6]认为其具有雌激素样效应,能诱导包括尿道下裂、隐睾、小阴茎畸

形等在内的一系列生殖系统畸形。本研究结果显示，DEHP孕期暴露后，其雄性活产仔鼠的数量、体质量和具有性别鉴别标识标志的AGD亦显著减少或缩短，验证了DEHP的雌激素样作用和对子代的发育毒性。

男性外生殖器的形成是一个复杂的发育过程，包括遗传程序、细胞分化、激素信号、酶活性和组织重塑，这些必须以时间和浓度依赖的方式有条不紊的进行[7]。尿道下裂的发生主要是由于包皮和尿道的环形闭合障碍，研究[8]发现在人类阴茎发育过程中，存在尿道嵴融合形成尿道上皮缝以及随后的尿道缝重塑过程，任何影响尿道缝形成和重塑的因素均可能导致尿道下裂。

ERK属于MAPK家族，是进化过程中非常保守的激酶，是上游信号的重要执行者，活化后的ERK(p-ERK)将会参与到大量的生理过程中，如增殖、分化、存活、凋亡以及应激等。ERK的活化是由MEK催化其活化环路上苏氨酸和络氨酸残基同时磷酸化所介导，这个磷酸化造成巨大的构象改变，能完全活化ERK以及与其底物之间的相互作用。这一巨大的构象变化能提高ERK的催化率，使其活力较之于基础活力提高5～6个数量级[9]。本研究中，我们观察到p-ERK蛋白在DEHP组胎鼠阴茎中的表达丰富，而对照组无表达。

前面提到的尿道下裂全基因组芯片研究[5]发现差异性表达最丰富的区域除了MAPK，也包括β型转化生长因子(TGF-β)。TGF-β涉及多种生物过程的调控，如胚胎发育、纤维化、肿瘤、免疫调节和创面愈合等。国外相关研究[10]发现TGF-β1过表达与尿道下裂发生密切相关。本课题组前期研究[3-4]结果显示，DEHP灌胃的实验组胎鼠阴茎组织中TGF-β1的表达较对照组明显升高。有研究[11]发现，TGF-β1的表达上调可以通过激活Ras、Raf，进一步激活MEK，而活化的MEK唯一的功能是激活ERK。如前所述，p-ERK将会参与多种细胞生理过程，包括激活激活蛋白1(AP1)和凝血酶敏感蛋白1(TSP1)，前者是TGF-β1转录因子，它的活化可以刺激TGF-β1的转录；而后者则是TGF-β1活化的关键因素[12-13]。另外，ERK通路与TGF-β1通路之间存在交叉反应，TGF-β1通过激活Smad产生其作用，而p-ERK也可激活Smad，从而产生与TGF-β1类似的作用[14]。

本研究中，我们观察到p-ERK蛋白在DEHP组胎鼠阴茎中的表达丰富，而对照组无表达，结合课题组前期研究成果，我们推测ERK在实验组胎鼠阴茎中与TGF-β1发生交叉反应，导致ERK被磷酸化激活。活化后的p-ERK继续与TGF-β1产生整合作用，打乱了正常尿道发育的调控，从而导致尿道下裂的发生。因此，我们推测ERK可能也是尿道下裂发生的调控因素之一。但是，这样一个TGF-β1、ERK双信号途径，二者之间是如何进行信号传递和调控？它们之间谁占主导地位？这有待于进一步的实验。探索TGF-β1和ERK之间的相互关系及作用方式将会更好地解释ERK在尿道下裂发生中的作用。

参考文献：

[1] Li Y, Mao M, Dai L, *et al*. Time trends and geographic variations in the prevalence of hypospadias in China [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2012, 94(1): 36-41.
[2] 李明勇，陈柏林，邱林，等. 塑化剂邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯诱导大鼠尿道下裂的研究[J]. 第三军医大学学报，2012，34(20)：2124-2126.
[3] 陈柏林，刘星，吴盛德，等. 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯诱导大鼠尿道下裂及对阴茎TGF-β1、TGF-βR3表达的影响[J]. 生殖与避孕，2011，31(2)：88-92，101.
[4] Liu X, He D W, Zhang D Y, *et al*. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) increases transforming growth factor-beta1 expression in fetal mouse genital tubercles [J]. J Toxicol Environ Health A, 2008, 71(19): 1289-1294.
[5] Ross A E, Marchionni L, Phillips T M, *et al*. Molecular effects of genistein on male urethral development[J]. J Urol, 2011, 185(5): 1894-1898.
[6] Wittassek M, Koch H M, Angerer J, *et al*. Assessing exposure to phthalates - the human biomonitoring approach [J]. Mol Nutr Food Res, 2011, 55(1): 7-31.
[7] Kalfa N, Sultan C, Baskin L S. Hypospadias: etiology and current research [J]. Urol Clin North Am, 2010, 37(2): 159-166.
[8] Baskin L S, Erol A, Jegatheesan P, *et al*. Urethral seam formation and hypospadias [J]. Cell Tissue Res, 2001, 305(3): 379-387.
[9] Zhang F, Strand A, Robbins D, *et al*. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 A resolution [J]. Nature, 1994, 367(6465): 704-711.
[10] Willingham E, Baskin L S. Candidate genes and their response to environmental agents in the etiology of hypospadias[J]. Nat Clin Pract Urol, 2007, 4(5): 270-279.
[11] Yasuda J, Whitmarsh A J, Cavanagh J, *et al*. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(10): 7245-7254.
[12] Zenz R, Wagner E F. Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(7): 1043-1049.
[13] Naito T, Masaki T, Nikolic-Paterson D J, *et al*. Angiotensin II induces thrombospondin-1 production in human mesangial cells *via* p38 MAPK and JNK: a mechanism for activation of latent TGF-beta1[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 286(2): F278-F287.
[14] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling [J]. Nature, 2003, 425(6958): 577-584.

（**收稿**：2013-03-12；**修回**：2013-04-23）
（编辑 黄 超）