

## · 论著 ·

## HoxA 13 基因在尿道下裂胎鼠阴茎中的表达及意义

熊 晶<sup>1</sup> 刘 颖<sup>2</sup> 魏光辉<sup>3</sup> 刘 星<sup>3</sup> 张德迎<sup>3</sup> 吴盛德<sup>3</sup>

**【摘要】 目的** 研究尿道下裂胎鼠阴茎中 *HoxA13* 核酸及其蛋白的表达,探讨其与尿道下裂发生的相关性。**方法** 选用清洁级 C57BL/6 小鼠,用邻苯二甲酸二(2-乙基)己脂(DEHP)诱导并建立先天性尿道下裂模型;交配怀孕后,孕鼠随机分为玉米油对照组、实验组(DEHP 500 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>);各组持续灌胃;于怀孕第 19 天取出仔鼠,测量各组雄鼠体重、AGD;统计各组胎鼠尿道下裂的发生率,并观测阴茎的组织病理学变化;应用常规 RT-PCR 及免疫组织化学方法检测诱导出的尿道下裂胎鼠及正常对照胎鼠阴茎组织中 *HoxA13* 的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 对照组、实验组的 AGD 值分别为(0.208 ± 0.01)cm、(0.181 ± 0.12)cm,  $P < 0.01$ ;尿道下裂发生率分别为 0%、75.7%,  $P < 0.01$ 。实验组胎鼠尿道板及包皮于阴茎腹侧隆起融合落后,该组尿道与腹侧皮肤间的皮下组织明显减少。DEHP 500 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>诱导的尿道下裂胎鼠阴茎组织中 *HoxA13* mRNA 及蛋白表达较对照组明显降低。**结论** DEHP 能影响胎鼠的生长发育及体重,并导致雄鼠外生殖器发育异常;*HoxA13*mRNA 及蛋白的表达在 DEHP 诱导的尿道下裂胎鼠阴茎中均较正常对照组降低,提示 *HoxA13* 基因异常表达可能是尿道下裂的发生机制之一。

**【关键词】** 基因表达;二乙基己基邻苯二甲酸;尿道下裂;阴茎

**HoxA13 mRNA and protein expression and its etiology value in mice genitalia of hypospadias induced by exposing to Di(2-ethylhexyl) phthalate.** XIONG Jing<sup>1</sup>, LIU Ying<sup>2</sup>, WEI Guang-hui<sup>3</sup>, et al. 1, Department of Urology, Taihe Hospital Affiliated to Huber University of Medicine, Shiyuan, Huber, 442000, China; 2, Department of Preventive Medicine, Huber University of Medicine, Shiyuan, Huber, 442000, China; 3, Department of Pediatric Urology, Chongqing Children's Hospital, Chongqing Medical University, 400014, China.

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of *HoxA13* in mice genitalia of hypospadias, we compared the gene's mRNA/protein expression in normal versus hypospadias mice penile using molecular localization techniques. **Methods** Pregnant C57BL/6 mice were selected and randomly divided into two groups; one treated with Di(2-ethylhexyl)phthalate 500 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>; and the mice in control group were received same volume of corn oil. Fetal mice were harvested at GD19. The body weight and anogenital distance of male fetal mice were measured. And the incidences of hypospadias genitalia as well as the changes of the histopathology in each group were examined. Subsequently, the mRNA and protein levels of *HoxA13* in genitalia were determined using RT-PCR and immunohistochemistry. **Results** The incidence of hypospadias genitalia were higher obviously than those in control group (incidence of hypospadias genitalia 75.5%, 0%,  $P < 0.01$ ; AGD: 0.208 ± 0.01, 0.181 ± 0.12,  $P < 0.01$ ); The result of histopathology in genitalia: the procedure of development of the penile urethra involves the movement or growth of the urethral folds toward the midline fell behind. *HoxA13* mRNA expressions in fetal mice genitalia of hypospadias were reduced obviously than those in control. *HoxA13* protein also expressed in epidermis. In tissue of hypospadias, the protein showed weakly positive, but manifested strongly positive in the controls. **Conclusion** DEHP is very toxic to the fetal mice including urogenital development and body weight, and can induce hypospadias in fetal male mice. *HoxA13* mRNA/protein expressions in fetal mice genitalia of hypospadias were reduced obviously than those in control. It cued that the relationship of *HoxA13* and hypospadias was closely.

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2011.05.007

作者单位:1,湖北省十堰市湖北医药学院附属太和医院泌尿男科(湖北省十堰市,442000),E-mail:alex7023@126.com;2,湖北省十堰市湖北医药学院预防教研室(湖北省十堰市,442000);3,重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科(重庆市,400014),通讯作者:魏光辉

【Key words】 Gene Expression; Diethylhexyl Phthalate; Hypospadias; Penis

尿道下裂是一种常见的男性泌尿生殖系统先天性畸形,发病率有明显上升趋势,其发病机理尚不清楚。近年来人们对尿道发育的分子机制有了进一步认识,认为 *HoxA13* 基因与泌尿生殖系统畸形的发生有关<sup>[1]</sup>。为了研究其与尿道下裂发生的相关性,作者使用邻苯二甲酸二(2-乙基)己脂(DEHP)诱导及建立先天性尿道下裂模型,并检测尿道下裂胎鼠及正常对照组阴茎中 *HoxA13* 基因的表达,以明确两者之间的关系。

## 材料与方法

### 一、实验动物分组及给药

取清洁级 C57BL/6 小鼠,约 8~9 周龄,体重 19~21 g 左右,均由重庆医科大学实验动物中心提供。在合适环境中适应性饲养 1 周后,将雌雄小鼠按 2:1 于下午 5:30 配对合笼喂养,次晨 8:30 检查雌鼠阴道和鼠笼下面的粪盘是否有阴栓,发现有阴栓即分笼喂养并定当天为怀孕的第 0.5 天(GD 0.5)。采用本课题组已经建立诱导小鼠尿道下裂模型的方法<sup>[2]</sup>,孕鼠分为对照组、实验组(DEHP 500 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),于 GD 12~17 期间于每日相同时间连续灌胃,对照组以 0.1 mL 玉米油灌胃,实验组将相应剂量药物溶于 0.1 mL 玉米油中进行灌胃。

### 二、标本观察及取材

于 GD19 断颈处死孕鼠,统计胎鼠的数量、体重,根据有无阴茎或睾丸判断胎鼠性别。解剖显微镜下观察阴茎、尿道口的位置、记录 AGD。阴茎变短、尿道开口于阴茎腹侧、腹侧包皮分裂、龟头外露即为尿道下裂胎鼠。将实验组中诱导的尿道下裂胎鼠及配对选择的对照组胎鼠予断颈法处死,于解剖显微镜下取阴茎标本,用 DEPC 水反复冲洗后分别存放于液氮及 4% 多聚甲醛中保存以备使用。

### 三、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

每组随机取 20 个标本提取总 RNA;配制逆转录体系按照试剂说明操作,合成的 cDNA 于 -20 ℃ 冰箱中保存。作者选择小鼠 GAPDH 作为内参照基因,参照 GenBank 序列使用 primer 5 软件设计 *HoxA13* 及 GAPDH 的特异性引物,长度见表 1。PCR 为 40 μL 反应体系,反应条件:95 ℃ 15 min,95 ℃ 40 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,72 ℃ 7 min,35 个循环。反应产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中电

泳,经紫外凝胶成像分析系统分析目的片段扩增带和 GAPDH 扩增带,用两者灰度值的比表示 *HoxA13* 的相对含量。

表 1 *HoxA13* 及 GAPDH 的常规 PCR 引物序列

引物名称	引物序列	扩增片段长度(bp)
<i>HoxA13</i>	F:5' - gtgcgggctacctggata - 3'	216
	F:5' - gctggcgtctgaaggatgg - 3'	
GAPDH	F:5' - ggtgaaggctcgtgtgaacg - 3'	233
	F:5' - ctgcctcctggaagatgga - 3'	

### 四、免疫组织化学检查

将 4% 多聚甲醛固定的组织进行常规石蜡包埋后切片,切片厚 6 mm。经脱蜡、水化,微波抗原修复,山羊血清封闭,滴加一抗(1:200)于 4 ℃ 孵育过夜。DAB 显色,苏木素复染,封片,摄像。用已知阳性片作为对照,PBS 代替一抗作空白对照。

### 五、统计学处理

应用 SAS6.12 统计软件进行统计学分析,相关系数的显著性检验采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、DEHP 对雄性胎鼠尿道的影响

实验组胎鼠的阴茎较正常对照组短小,AGD 较对照组明显缩短,见表 2,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。以尿道开口位于阴茎体腹侧为判断尿道下裂的标准。DEHP 诱导的尿道下裂胎鼠其尿道口异位,开口于阴茎腹侧或阴茎与会阴交接处,并伴随腹侧包皮分裂、龟头外露。

表 2 各组胎鼠 AGD 及尿道下裂发生率比较

分组	胎鼠数(只)	AGD(cm)	尿道下裂发生率(%)
对照组	67	0.208 ± 0.01	0
实验组	72	0.181 ± 0.12 ☆	75.7 ◆

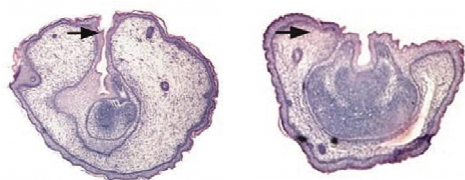
注:☆◆,与对照组比较, $P < 0.01$

### 二、尿道下裂胎鼠阴茎组织形态学分析

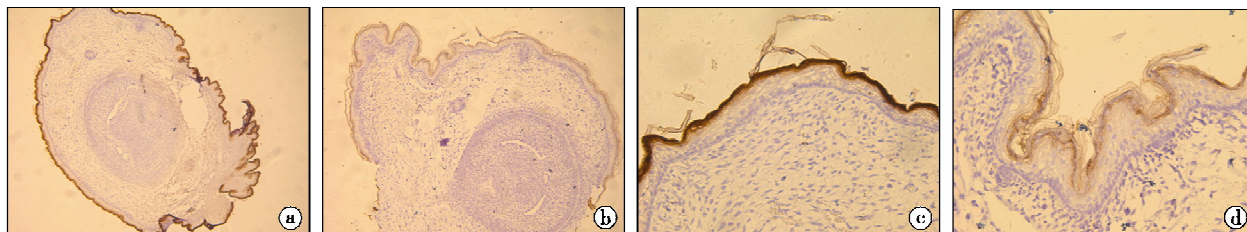
通过对尿道下裂胎鼠阴茎和正常胎鼠阴茎相同层面的组织切片比较发现,正常胎鼠阴茎中,尿道轴位于阴茎体中央,开口于阴茎顶端;尿道下裂胎鼠尿道轴偏向阴茎腹侧,尿道板于阴茎腹侧隆起融合缓慢,在阴茎根部尿道与腹侧皮肤间的皮下组织明显减少,腹侧包皮缺如,见图 1。

### 三、胎鼠阴茎中 *HoxA13* 蛋白的表达

选择 DEHP500 诱导的尿道下裂胎鼠及正常对



A, 对照组; B, 实验组  
图 1 各组胎鼠阴茎横断面(HE 染色)



A, 对照组(DAB, ×200); B, 实验组(DAB, ×200); C, 对照组(DAB, ×400); D, 实验组(DAB, ×400)

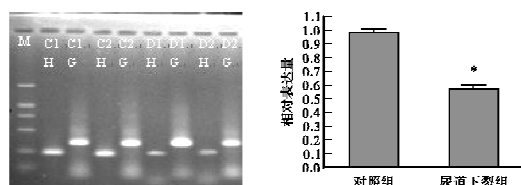
图 2 各组 *HoxA13* 蛋白的表达

与内参照 GAPDH 条带密度比值(A 值)来表示目的产物的相对表达强度,凝胶电泳结果显示与对照组相比,*HoxA13* 在 DEHP 诱导的尿道下裂胎鼠阴茎组织中表达明显下调,见表 3 及图 3。

表 3 各组 *HoxA13*mRNA 的表达

分组	胎鼠数(只)	平均表达量
对照组	20	0.985 ± 0.043
实验组	20	0.574 ± 0.054 ☆

注:☆,与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。



C: control; D: Hypospadias induced by DEHP; H: *HoxA13*; G: GAPDH

图 3 各组中 *HoxA13*mRNA 的表达

## 讨论

尿道下裂是小儿泌尿生殖系统最常见的先天性畸形之一,流行病学调查发现近年来其发生率逐渐上升<sup>[3]</sup>。随着研究的深入,人们对其发病原因有了新的认识,但仍有部分病例未能查明具体原因<sup>[4]</sup>。临床中发现部分尿道下裂相关畸形综合征患儿中 *HoxA13* 基因存在突变,且有研究证实 *HoxA13* 基因敲除小鼠出现尿道口异位、AGD 变短及腹侧包皮缺如等尿道下裂样表现<sup>[5-6]</sup>。为此,作者运用邻苯二甲酸二(2-乙基)己脂(DEHP)诱导建立尿道下裂

对照组胎鼠阴茎切片,于光学显微镜下观察,发现 *HoxA13* 蛋白定位表达于阴茎皮肤表皮层,且两组阴茎组织中均有表达。尿道下裂胎鼠阴茎中 *HoxA13* 蛋白的表达较正常对照组明显降低,见图 2。

## 四、胎鼠阴茎中 *HoxA13*mRNA 的表达

实验组及对照组均有 *HoxA13*:216 bp 和内参照 GAPDH:233bp 两个条带出现。以 *HoxA13* 条带密度

模型,并检测尿道下裂及正常胎鼠阴茎中 *HoxA13* 基因核酸及蛋白的表达,以探讨其在尿道下裂发生中的意义。

按照课题组前期尿道下裂模型的建立方法进行实验,结果发现 DEHP 组中胎鼠 AGD 较对照组明显缩短,且尿道下裂的发生率显著升高;病理切片检查显示尿道下裂胎鼠尿道轴偏向阴茎腹侧,尿道板于阴茎腹侧隆起融合缓慢,在阴茎根部尿道与腹侧皮肤间的皮下组织明显减少,腹侧包皮缺如。DEHP 对胎鼠阴茎及 AGD 大体标本的影响结合病理组织学变化说明此模型的科学性与有效性。

正常情况下,尿生殖结节发育中尿道板上皮区域作为信号中心分泌某些蛋白,实时调节尿道板上皮及其周围间质细胞的增生与凋亡过程,使尿道板两侧尿生殖嵴由近至远逐渐融合最终形成管状尿道<sup>[7]</sup>。*HoxA13* 属于发育基因,是从时间和空间上对生物体的发育进行调控的同源盒基因家族中的一员,主要通过调节参与胚胎发育的下游基因功能,完成细胞的增殖、分化、迁移以及黏附过程,进而影响胚胎部分组织、器官的发育<sup>[8-9]</sup>。在胎鼠生殖结节内,*HoxA13* 特异表达于尿道发生的元基,即尿道上皮及尿道板,此为生殖结节发育的分子信号中心,并与众多相关基因形成信号系统<sup>[1]</sup>。另有研究发现 *HoxA13* 基因敲除小鼠外生殖器变短甚至缺如,证明 *HoxA13* 在胚胎期尿生殖结节的发生、发育中有重要作用<sup>[10]</sup>。本研究运用定量 PCR 及免疫组织化学方法分别检测尿道下裂及对照组胎鼠阴茎中 *HoxA13* 的核酸及蛋白质表达,结果显示尿道下裂组 mRNA

及蛋白质表达均显著低于对照组,因此,推测 *HoxA13* 基因表达降低可能影响尿道的正常发育,导致尿道下裂发生。有学者发现 *HoxA13* 基因敲除小鼠远端尿道板上皮细胞增生、凋亡较正常对照组严重降低,尿道板上皮层相对增生、变厚,并阻碍增生的间质细胞从两侧融合;同时,突变小鼠雄激素受体在外胚层、尿道板上皮及其周围间质中的表达均较正常明显下降<sup>[11-14]</sup>。另外,通过 *HoxA13* 表达异常时尿道板上皮细胞增殖、凋亡情况及相关基因表达的研究,可为尿道下裂的分子发生机制提供更多的理论依据。

### 参考文献

- 1 Willingham E, Baskin LS. Candidate genes and their response to environmental agents in the etiology of hypospadias[J]. Nat Clin Pract Urol, 2007, 4(5): 270-279.
- 2 刘星, 魏光辉, 熊晶, 等. 邻苯二甲酸二(2-乙基)己脂(DEHP)诱导小鼠尿道下裂及对阴茎 TGF- $\beta$ [J]. 中华小儿外科杂志, 2008, 29: 565-568.
- 3 吴艳乔, 代礼, 王艳萍. 中国儿童尿道下裂发生率的变化趋势[J]. 四川大学学报(医学版), 2005, 36(2): 274-276.
- 4 Baskin LS, Himes K, Colborn T. Hypospadias and endocrine disruption: is there a connection[J]. Environ Health Perspect, 2001, 109(11): 1175-1183.
- 5 Mitsubuchi H, Endo F. Hand-foot-genital syndrome[J]. Nippon Rinsho, 2006, 28; Suppl 2: 647-648.
- 6 Xavier W, Catherine FR, Valérie F, et al. Gene dosage-dependent effects of the *Hoxa-13* and *Hoxd-13* mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts[J]. Development, 1997, 124: 4781-4791.
- 7 Haraguchi R, Mo R, Hui C, et al. Unique functions of Sonic hedgehog during external genitalia development[J]. Development, 2001, 128: 4241-4250.
- 8 Prince VE. The Hox Paradox: More complex(es) than imagined[J]. Dev Biol, 2002, 249: 1-15.
- 9 Lewin B. Homeodomains bind related targets in DNA[J]. Oxford University Press, 2000, 660-662.
- 10 Terence RJ, Lappin I, David G, et al. HOX GENES: Seductive Science, Mysterious Mechanisms[J]. Ulster Med J, 2006, 75(1): 23-31.
- 11 Kondo T, Zákány J, Innis JW, et al. Of fingers, toes and penises[J]. Nature, 1997, 6: 390(6655): 29.
- 12 Stadler HS. Modelling genitourinary defects in mice: an emerging genetic and developmental system[J]. Nat Rev Genet, 2003, 4(6): 478-482.
- 13 Morgan EA, Nguyen SB, Scott V, et al. Loss of *Bmp7* and *Fgf8* signaling in *Hoxa13*-mutant mice causes hypospadias[J]. Development, 2003, 130(14): 3095-3109.
- 14 Scott V, Morgan EA, Stadler HS. Genitourinary functions of *Hoxa13* and *Hoxd13*[J]. J Biochem, 2005, 137(6): 671-676.

### ·消息·

## 全国《小儿疾病超声诊断与临床》学习班通知

为提高超声医务工作者对于小儿疾病的超声诊断水平,增进儿科医师对超声诊断在临床作用的了解,经卫生部批准,湖南省儿童医院拟于 2011 年 10 月 31 日至 11 月 5 日举办第 6 期全国《小儿疾病超声诊断与临床》学习班(国家级继续医学教育项目,编号 2011-09-02-112)。学习结束将授予国家级继续医学教育 I 类学分 10 分。

本次学习班将邀请国内知名超声专家、经验丰富的小儿及胎儿超声诊断专家和儿科专家讲课,内容包括小儿颅脑、消化系统疾病(肠旋转不良、膈疝、重复畸形、幽门肥厚、食道裂孔疝、美克尔憩室、胆道闭锁、肝脏肿瘤、胆道畸形肠壁增厚性疾病等)、小儿肿瘤、骨关节肌肉疾病(先天性髋关节脱位、化髋、软组织肿瘤)超声诊断及误诊病例分析,胎儿心脏疾病的超声筛查和小儿阑尾、回盲部寻找技巧以及超声诊断在临床小儿和新生儿科的应用。

联系地址:湖南省长沙市梓园路 86 号,湖南省儿童医院特检科,邮编 410007,联系人:彭巧玉:13677485001、0731-85600930,何静波:15873155519、0731-85600977,陈文娟:13707484196、0731-85356040,传真:0731-85356666, E-mail: hjb8272003@yahoo.com.cn。欢迎全国各级医院、儿童医院、妇幼保健院的超声医务工作者和小儿内外科、新生儿科医师报名参加,可通过电话、电子邮件或短信报名,报名截止日期:2011 年 10 月 20 日。

湖南省儿童医院

湖南省超声医学专业委员会