

· 论著 ·

ATF3 在单纯性尿道下裂中的表达及意义

李远伟¹ 赵晓昆² 高智勇¹ 吴万瑞¹ 樊皓明¹ 何 军³

【摘要】 目的 研究激活转录因子 3(Activating transcription factor 3, ATF3)在尿道下裂包皮组织中的表达情况,探索 ATF3 与散发的单纯性尿道下裂之间的关系。**方法** 采用免疫组织化学方法,在蛋白质水平检测 ATF3 蛋白在散发的单纯性尿道下裂患者和对照组之间的表达情况。采用 RT-PCR 的方法,在 RNA 水平检测 ATF3 mRNA 在两组之间的表达差异。**结果** ATF3 蛋白在散发的单纯性尿道下裂中的阳性表达率为 90%(27/30),在对照组中为 10%(2/20),两组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。散发的单纯性尿道下裂患者 ATF3 mRNA 的相对表达量为 0.5375 ± 0.0591 ,对照组相对表达量为 0.4193 ± 0.0678 ,两组比较,差异有统计学意义。从数据上看,重型组中 ATF3 mRNA 相对表达量高于其它两组。**结论** 正常人包皮组织中 ATF3 表达量很少,散发的单纯性尿道下裂患者包皮组织中 ATF3 的表达明显增多,提示 ATF3 和散发的单纯性尿道下裂关系密切。进一步研究尿道下裂中 ATF3 产生的分子基础和 ATF3 相关的信号转导通路,有可能揭示散发的单纯性尿道下裂的病因。

【关键词】 尿道下裂/病理学;尿激酶;基因表达

ATF3 is up-regulated in sporadic cases of isolated hypospadias. LI Yuan-wei, ZHAO Xiao-kun, GAO Zhi-yong, et al. 1, Department of Urology, The First Affiliated Hospital, Hunan Normal University, Changsha, 410005, China. 2, Changsha, 410008, China, 3, Hunan Children's Hospital, Changsha, 410007, China

【Abstract】 Objective To examine the expression of Activating transcription factor 3(ATF3) in prepuce tissues, and to explore their relations to sporadic cases of isolated hypospadias. **Methods** Protein and mRNA were detected by immunohistochemistry and semiquantitative RT-PCR, we quantified the expression differences of ATF3 in hypospadiac and control tissues. **Results** The expression of ATF3 in prepuce tissues from 30 boys with isolated hypospadias and 20 boys with normal prepuce tissue were examined by immunohistochemistry. Of the 50 specimens 27(90%) of the 30 patients with hypospadias showed expression of ATF3 protein, and only 2 (10%) of the 20 patients in control group were positive ($P < 0.05$). Detected by semiquantitative RT-PCR, The ATF3 mRNA relative expression levels was 0.5375 ± 0.0591 , 0.4193 ± 0.0678 for hypospadias samples and normal samples respectively, and the difference between them was statistically significant. The expression levels of ATF3 mRNA were stronger in patients with severe hypospadias compared with mild and moderate hypospadias. **Conclusions** Our results indicate that ATF3 is up-regulated in the prepuce tissues of boys with sporadic hypospadias, suggesting a role for this transcription factor in the development of this abnormality. Research in the areas of ATF3 gene may open new avenues toward increased understanding of the cause of hypospadias.

【Key word】 Hypospadias/PA; Urokinase; Gene expression

尿道下裂是男性泌尿生殖系统最常见的先天性畸形之一,尿道下裂的发病率呈逐年升高趋势,家族性尿道下裂约占 7%,大部分是散发的、无遗传和家族史的单纯性尿道下裂^[1]。现已发现多个与尿道下裂有关的基因。Liu 等^[2]报道尿道下裂中 ATF3 表达上调,提示转录因子 ATF3 所涉及转录调控和

尿道下裂的发生有关。本研究测定激活转录因子 3(Activating transcription factor 3, ATF3)在散发的单纯性尿道下裂患者包皮组织中的表达,现报告如下。

材料与方法

一、临床资料

选择 2005 年 4 月至 2006 年 2 月在湖南省人民医院及中南大学湘雅二医院住院和门诊治疗的尿道下裂及包皮手术患者 50 例。尿道下裂组 30 例,平均

作者单位:1, 湖南省人民医院泌尿外科(长沙市,410005); E-mail:liyuanwei@163.com。2, 中南大学湘雅二医院泌尿外科; E-mail:xiaokunzhao2002@yahoo.com.cn。3, 湖南省儿童医院泌尿外科。通讯作者:赵晓昆,本研究为湖南省自然科学基金资助项目(05jj30056)和长沙市科技局基金资助项目(2006 年)。

年龄 6.3(3~17)岁。根据阴茎伸直后尿道外口位置分为轻型(阴茎头型、冠状沟型、阴茎远侧型)、中型(后 2/3 阴茎干型)、重型(阴茎阴囊型、阴囊型、会阴型)。其中轻型 7 例(冠状沟型 3 例、阴茎远侧型 4 例),中型 10 例,重型 13 例(阴茎阴囊交界型 12 例,会阴型 1 例)。均为散发性患者,均无泌尿生殖系统的其它异常。对照组 20 例,均为接受包皮环切术的患者,平均年龄 7(3~18)岁。无其它合并症存在。

二、实验方法

1.标本处理:收集术中多余的包皮组织,将每份标本分成两份,分别做好标记后装入冻存管,立即置于液氮罐中保存。

2.ATF3mRNA 的测定

选择 GAPDH 作为内参照基因,设计 ATF3 和 GAPDH 的 PCR 引物,使引物分别位于不同外显子中,以便区别 cDNA 和 gDNA 扩增产物,ATF3 基因片断的引物序列为:正义 5'TCGGGGTCTCCATCA-CAAAAGC'3,反义 5'CTTCTCTTCTTGAGC TCCTCAATC'3,扩增片断长度为 218bp,GAPDH 引物:正义 5'CATTGGGTGTGA AC CATGAGAAGT'3,反义 5'GTTTCAGCTCAGGGATGACCTTG'3,扩增片断长度为 280 bp。

TRIzol 法提取组织中的总 RNA,提取的 RNA 立即用于逆转录或保存于 -70℃超低温冰箱中。凝胶电泳鉴定 RNA 质量,紫外分光光度计测定 RNA 含量,按照 Promega 公司的逆转录试剂盒说明进行逆转录,合成 cDNA。

聚合酶链式反应(PCR):对每个 RNA 模板进行一个无逆转录的对照实验,以确定一个给定片段是来自基因组 DNA 还是 cDNA,在无逆转录时所得到的 PCR 产物来源于基因组 DNA。各 PCR 体系均设置阴性对照,以无核酶水代替模板 cDNA,每份检测标本的 PCR 反应在相同条件下重复 3 次以保证其扩增的正确性。PCR 反应体系与 PCR 反应条件:本实验为 20 μ l 反应体系,95℃预变性 3 min;以 95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,循环 30 次;72℃延伸 7 min,4℃终止反应。为了保证实验结果的可靠与准确,在同一 PCR 管中加入 ATF3 和 GAPDH 的引物,同时扩增 ATF3 和 GAPDH 基因片断,以得到更为精确的 ATF3mRNA 相对表达量。2%琼脂糖凝胶在电压 85V 进行电泳,电泳约 1.5 h 后,取出凝胶置于暗箱式紫外线透射仪下观察,可见到核酸染料染色的特异性条带。将凝胶置于凝胶成像分析系统照相保存,进行图像分析,测量 ATF3

基因和内参照基因 GAPDH 的扩增片断密度的比值,计算出 ATF3mRNA 的相对含量(半定量),ATF3mRNA 的相对含量 = ATF3 的 OD 值 / GAPDH 的 OD 值。

3.免疫组织化学方法鉴定 ATF3 蛋白的表达

处理切片:本实验中 ATF3 抗体要求为冰冻切片,从液氮中取出标本或将术中标本立即切片,对已切好的切片立即进行免疫组化,或将切片储存于 -20℃,在 24 h 内进行实验。本实验一抗最佳浓度 1:400,4℃过夜。按说明书配制 DAB 显色剂,在显微镜下掌握染色的程度。实验中以 PBS 代替一抗作阴性对照。结果判定方法:由 2 名病理科医生采用盲法阅片的方式进行。结果判定标准:ATF3 定位于细胞核上,以细胞核内出现棕褐色颗粒的细胞定为阳性细胞,每张切片选取 5 个高倍视野($\times 400$ 倍),每个视野随机计数 100 个细胞,求其平均阳性率。

三、统计学处理

全部数据经统计学软件 SPSS 11.5 处理,计数资料用阳性例数或阳性率表示,阳性率之间的比较用 χ^2 检验。两组之间的均数比较采用 t 检验,两组以上均数之间的比较采用方差分析(ANOVA),ATF3 蛋白在两组人群包皮组织中的表达比较选用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、GAPDH 基因表达

TRIzol 法提取包皮组织中的总 RNA 经紫外分光光度计测定 OD260 / OD280 的比值为 1.78 ~ 1.9。所有待检组织标本内参照 GAPDH 基因均为阳性表达,扩增的片断在 280 bp 左右。

二、尿道下裂的严重程度和 ATF3mRNA 相对表达量的关系

所有样本的 RT-PCR 均获成功,尿道下裂轻型、中型和重型 3 组样本的 ATF3 mRNA 相对表达量分别为 0.5331 ± 0.0619 , 0.5299 ± 0.0654 , 0.5375 ± 0.0591 ,重型尿道下裂 ATF3mRNA 相对表达量高于其它两组。

三、尿道下裂组和对照组之间 ATF3 mRNA 相对表达量的比较

尿道下裂组 ATF3mRNA 相对表达量为 0.5375 ± 0.0591 ,对照组相对表达量 0.4193 ± 0.0678 ,两组比较, $t = 6.527$, $P < 0.001$,差异有显著统计学意义。

四、ATF3 蛋白在包皮组织中的表达情况

尿道下裂组包皮组织中 ATF3 蛋白表达的阳性率为 27/30,其中轻型为 5/7,中型为 9/10,重型为 13/13,对照组为 2/20,尿道下裂组和对照组经卡方检验, $\chi^2=32.53, P<0.001$,差异有显著统计学意义。尿道下裂轻、中、重型之间 ATF3 蛋白表达因分组后样本量较少而未行统计学处理。

讨 论

近年来,学者们从各个方面探索了尿道下裂的病因,但其确切发病机制仍不清楚。随着分子生物学的发展,人们试图从分子学水平揭示尿道下裂的发生,以从发生上进行干预。现已发现多个与尿道下裂有关的基因,例如 II 型 3- β 羟类固醇脱氢酶基因、MID1 基因、SRD5A2 基因和 TGF 基因等^[3,4,5],但仍无法完全解释单纯性尿道下裂的发生机理。

激活转录因子 3(ATF3)是碱性亮氨酸拉链区(bZIP)家族中 ATF/CREB 亚家族的成员之一,人全长 ATF3 基因有 4 个外显子,该基因编码的蛋白由 181 个氨基酸组成,最早在十四烷酰法波醋酸酯处理人子宫颈腺癌传代细胞系 HeLa 细胞中分离得到。以往研究发现,ATF3 在细胞生长和分化过程中具有多种功能,对细胞生长具有间接的正性或负性调控作用。Fan 等^[6]发现,ATF3 蛋白对细胞生长起负性调控作用,通过 tet-off 系统诱导 ATF3 表达,发现 ATF3 蛋白能减缓细胞从 G₁ 期进展至 S 期,ATF3 蛋白的过度表达能抑制细胞生长,说明 ATF3 对细胞周期具有负性调控作用。在对转基因小鼠的研究中,发现在各种组织中表达 ATF3 的转基因鼠出现了相应组织的功能障碍。Allen-Jennings 等^[7]发现在胰腺表达 ATF3 的转基因小鼠出现了胰腺发育障碍,分泌激素的细胞数量减少。对转基因小鼠的胚胎分析显示,ATF3 在胰腺管状上皮细胞的表达与未诱导 ATF3 基因表达的转基因小鼠相比,ATF3 阳性表达的转基因小鼠有丝分裂细胞更少,从转基因动物模型上证实了 ATF3 对细胞生长有调控作用。

本实验在蛋白质水平和 RNA 水平,发现 ATF3 在散发的单纯性尿道下裂中表达明显增多,进一步证实 ATF3 和单纯性尿道下裂的关系密切。该研究结果提示,转录因子 ATF3 所涉及的转录调控和尿道下裂的发生有关,ATF3 可能是尿道下裂中的一个关键调控基因。最近 Wang 等^[8]利用微阵列技术发现尿道下裂和 ATF3 基因相关,也进一步证实 ATF3 和尿道下裂的发生有密切关系。在尿道形成过程

中,ATF3 是否干扰了泌尿生殖细胞的分化和转化,有待于深入研究。

此外,近年来研究已证实雄激素功能相关基因以及雌激素受体基因均与尿道下裂的发生有关。Beleza-Meireles 等^[9]对 60 名尿道下裂患者进行雌激素受体基因 ESR1 和 ESR2 的突变检测,同时检测 ESR2 基因的 CA 重复多态性和 ESR1 基因的 TA 重复多态性,发现 ESR2 基因的 CA 重复多态和尿道下裂有关。目前研究证实,ATF3 与雌激素和雄激素均有关。Inoue 等^[10]采用微阵列技术分析了人乳腺癌细胞系中雌激素应答基因的表达式,发现 ATF3 基因是雌激素应激基因之一。Pelzer 等^[11]采用免疫组化和免疫印迹方法,在体外和体内实验中发现前列腺癌细胞系中 ATF3 基因的表达上调,ATF3 基因的过度表达促进了前列腺癌细胞的增殖,加速了细胞从 G₁ 期到 S 期的转变。同时发现雄激素能促进前列腺癌细胞中 ATF3 的表达,用抗雄激素药物干预后 ATF3 基因表达则减少,提示 ATF3 基因是受雄激素调节的基因。以上研究表明,ATF3、雌激素和雄激素、尿道下裂三者之间存在一定的内在联系,进一步深入研究它们之间的关系,有可能揭示尿道下裂的病因。

尽管研究已发现多个性别分化基因、雄激素代谢相关基因与尿道下裂有关,但没有一个单独的基因能解释尿道下裂的共同发病机理。目前,有关散发的单纯性尿道下裂的研究不多,本实验初步证实了转录因子 ATF3 和散发的单纯性尿道下裂相关,ATF3 有可能通过调控尿道下裂相关基因的表达水平,或通过 ATF3 相关的信号转导通路,干扰尿道的正常发育而导致尿道下裂。进一步研究尿道下裂中产生 ATF3 的分子基础或它作用的靶基因,探索 ATF3 相关信号传导通路,有可能揭示散发的单纯性尿道下裂的发病机制。

参 考 文 献

- 1 Shukla AR, Patel RP, Canning DA. Hypospadias[J]. Urologic Clinics of North America, 2004, 31(3):445-460.
- 2 Liu B, Wang Z, Lin G, et al. Activating transcription factor 3 is up-regulated in patients with hypospadias[J]. Pediatr Res, 2005, 58(6):1280-1283.
- 3 唐华建, 袁继炎. 尿道下裂与 II 型 3 β 羟类固醇脱氢酶基因突变的研究[J]. 临床小儿外科杂志, 2002, 1(4):282-285.
- 4 徐家杰, 李森恺, 李强等. 尿道下裂患者 MID1 基因突变的研究[J]. 临床泌尿外科杂志, 2007, 22(2):146-147.
- 5 李浪, 魏光辉, 刘星等. α -SMA、TGF β 1 在尿道下裂阴茎

- 下弯组织中的表达及意义[J].重庆医科大学学报,2007,32(6):635-637.
- 6 Fan F, Jin S, Amundson SA, et al. ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth[J]. Oncogene, 2002, 21(49): 7488-7496.
- 7 Allen-Jennings AE, Hartman MG, Kociba GJ, et al. The roles of ATF3 in glucose homeostasis: a transgenic mouse model with liver dysfunction and defects in endocrine pancreas[J]. J Biol Chem, 2001, 276(31):29507-29514.
- 8 Wang Z, Liu BC, Lin GT, et al. Up-regulation of estrogen responsive genes in hypospadias: microarray analysis[J]. J Urol, 2007, 177(5): 1939-1946.
- 9 Beleza-Meireles A, Omrani D, Kockum I, et al. Polymorphisms of estrogen receptor beta gene are associated with hypospadias[J]. J Endocrinol Invest[J], 2006, 29(1): 5-10.
- 10 Inoue A, Yoshida N, Omoto Y, et al. Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes[J]. J Mol Endocrinol, 2002, 29(2):175-192.
- 11 Pelzer AE, Bektic J, Haag P, et al. The expression of transcription factor activating transcription factor 3 in the human prostate and its regulation by androgen in prostate cancer[J]. J Urol, 2006, 175(4):1517-1522.

• 病例报告 •

幼儿暴发性紫癜 1 例

张国辉 徐传臻 傅勇 刘文明 闫宏山 崔光怀

【关键词】急腹症 / 诊断; 急腹症 / 治疗; 婴儿, 新生, 疾病

幼儿暴发性紫癜(purpura fulminans, PF)是一种临床罕见病,常危及患儿生命。本院近期收治 1 例,现报告如下。


患儿,男,7 个月,因发热 6 d,腹泻 3 d,双下肢瘀斑 1 d 入院。体查:T 37.2℃,P 160 次/分,R 36 次/分,BP 65/40 mmHg,WT 7 kg。双小腿各有一处瘀斑,右侧约 5 cm × 6 cm 大小,左侧约 3 cm × 4 cm 大小,边缘清晰不规则,呈紫红色皮革样,局部皮温不高,瘀斑处组织肿胀明显,呈非凹陷性,全身浅表淋巴结无肿大。辅助检查:血常规 WBC $31.89 \times 10^9/L$,N 64.8%,RBC $4.2 \times 10^{12}/L$,Hb 100g/L,PLT $160 \times 10^9/L$,CRP 179.65mg/L;血液生化检查:Na⁺131.7 mmol/L,CO₂CP 11.6 mmol/L,BUN 12.96 mmol/L,CREA 156 ummol/L,Ca²⁺1.85 mmol/L。入院诊断为败血症,予抗感染、扩容、补液、静脉输注丙种球蛋白等治疗,病情无明显好转,体温升高,全身出现广泛对称性红色结节。以“脓毒血症”转入外科。予手术清创,术中见下腹部、双下肢 8 处散在对称分布的皮下结节,局部皮肤稍红,双小腿皮肤水肿变硬,小腿前外侧中、下 1/3 处皮肤片状坏死,呈紫黑色皮革样变,沿皮肤坏死边缘切开皮肤及皮下组织,见广泛坏死,深达肌膜,有黄白色脓液溢出,边缘潜行,呈坑道状,皮下血管有栓塞,肌肉组织未见异常。予完整切除坏死组织,吸净脓液,彻底清创引流。病理检查结果为左、右小腿皮肤过敏性紫癜,坏死性小血管炎;过敏性紫癜,表皮坏死型并短小杆菌感染。创面分泌物培养提示铜绿假单胞菌感染。血培养阴性。术后应用敏感抗生素,常规创面

换药,加强引流,输注血浆、丙种球蛋白,加强营养。1 个月后面创面清洁,肉芽生长良好,全身散在红色结节大部分消失或明显变小,残留右、左大腿外侧 2 处直径约 1~2 cm 大小的皮下结节。予双小腿清创植皮(厚刃皮)加双股部结节取出术,术中见结节内亦为黄白色脓液,予彻底清创,全层贯穿缝合。经细菌培养及药敏试验提示脓液性质同前,术后继续予抗生素治疗,双小腿创面皮片生长融合良好,创面封闭,痊愈。

讨论 过敏性紫癜为一种变态反应性疾病,起病急,可伴发热,常突发广泛严重出血,皮肤常出现蚕豆大小、圆形或椭圆形水肿性红斑瘀血,中心呈紫红色或有水泡,分布于四肢和躯干。临床特征为患感染性疾病的同时,突然出现全身皮肤大片对称性出血性瘀斑,迅速扩散融合,可发生皮肤或肢体干性坏死。常伴休克、DIC,甚至全身炎症反应综合征(MODS)^[1],呈暴发性经过,病死率及致残率均高。早期诊断、切开引流是治疗的关键。本病一旦确诊应立即清除病变部位坏死组织,以双氧水冲洗,并置留盐水纱条引流,应用抗生素,一般先采取替硝唑和第四代头孢菌素联合用药,待药物敏感试验后,改用敏感抗生素,加强支持治疗,早期应用免疫球蛋白,可增强患儿免疫力,缩短病程。另外,肠外营养支持、白蛋白及维生素有利于组织修复,待创面清洁后早期行游离皮片移植术可以封闭创面,减少并发症,降低病死率。

参考文献

- 1 闵安杰,牛永敢,张明华.暴发性紫癜并大面积皮肤坏死一例[J].中华外科杂志,2005,43(3):198.

作者: [李远伟](#), [赵晓昆](#), [高智勇](#), [吴万瑞](#), [樊皓明](#), [何军](#)
作者单位: [李远伟, 高智勇, 吴万瑞, 樊皓明 \(湖南省人民医院泌尿外科, 长沙市, 410005\)](#), [赵晓昆 \(中南大学湘雅二医院泌尿外科\)](#), [何军 \(湖南省儿童医院泌尿外科\)](#)
刊名: [临床小儿外科杂志](#) 
英文刊名: [JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY](#)
年, 卷(期): 2008, 7 (4)
被引用次数: 1次

参考文献(11条)

1. 唐华建;袁继炎 [尿道下裂与Ⅱ型3β羟类固醇脱氢酶基因突变的研究](#)[期刊论文]-[临床小儿外科杂志](#) 2002(04)
2. [Liu B;Wang Z;Lin G](#) [Activating transcription factor is up-regulated in patients with hypospadias](#) 2005(06)
3. [Allen-Jennings AE;Hartman MG;Kociba GJ](#) [The roles of ATF3 in glucose homeostasis:a transgenic mouse model with liver dysfunction and defects in endocrine pancreas](#) 2001(31)
4. [Fan F;Jin S;Amundson SA](#) [ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth](#) 2002(49)
5. 李浪;魏光辉;刘星 [α-SMA、TGFβ1在尿道下裂阴茎下弯组织中的表达及意义](#)[期刊论文]-[重庆医科大学学报](#) 2007(06)
6. 徐家杰;李森恺;李强 [尿道下裂患者MID1基因突变的研究](#)[期刊论文]-[临床泌尿外科杂志](#) 2007(02)
7. [Pelzer AE;Bektic J;Haag P](#) [The expression of transcription factor activating transcription factor 3 in the human prostate and its regulation by androgen in prostate cancer](#) 2006(04)
8. [Inoue A;Yoshida N;Omoto Y](#) [Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes](#) 2002(02)
9. [Beleza-Meireles A;Omrani D;Kockum I](#) [Polymorphisms of estrogen receptor beta gene are associated with hypospadias](#) 2006(01)
10. [Wang Z;Lju BC;Lin GT](#) [Up-regulation of estrogen responsive genes in hypospadias:microarray analysis](#) 2007(05)
11. [Shukh AR;Patel RP;Canning DA](#) [Hypospadias](#) 2004(03)

引证文献(1条)

1. [王莉](#), [董蓓](#), [江布先](#), [姜忠](#), [鹿洪亨](#) [3对孪生兄弟中尿道下裂4例报道](#)[期刊论文]-[临床小儿外科杂志](#) 2010(4)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200804010.aspx

授权使用: 黔南民族师范学院(gnnzsfxy), 授权号: b92715a7-9451-404a-8ab8-9ed40105b2ed

下载时间: 2011年4月29日