

Akt 信号通路在邻苯二甲酸二丁酯诱导雄性胎鼠发生尿道下裂中的表达研究

李寿春^{1,2}, 张力峰², 左立², 周忠兴², 张炜^(大)^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属常州市第二人民医院泌尿外科, 江苏 常州 213004)

[摘要] **目的:** 邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)孕晚期暴露诱导子代 Spraque-Dawley 大鼠发生尿道下裂, 探讨 Akt 信号通路及其下游关键蛋白核转录因子 κ B(nuclear factor- κ -gene binding, NF- κ B)在胎鼠生殖结节中的差异表达, 研究该通路在 DBP 致大鼠生殖系统发育异常过程中的作用机制。 **方法:** 孕 SD 大鼠 20 只, 随机分为染毒组和对照组, 在妊娠时间(gestation day, GD)14~18 d, 每天通过灌胃分别给予 DBP 800 mg/kg 和大豆油, 在 GD19 时提取染毒组发生尿道下裂胎鼠与对照组胎鼠的生殖结节组织, 用 Western blot 检测磷酸化 Akt(p-Akt)、Akt 和 NF- κ B 的表达情况, 同时用免疫组化分析 p-Akt 的表达情况。 **结果:** 尿道下裂组与对照组中 p-Akt、Akt 和 NF- κ B 相对表达量的比值分别为 3.057 ± 0.026 、 2.624 ± 0.073 和 3.524 ± 0.035 ($n = 10$, $P < 0.05$), 且尿道下裂组中 p-Akt 蛋白相对量在总蛋白中所占的比例较对照组高。 p-Akt 定位于生殖结节上皮细胞, 尿道下裂组 p-Akt 染色明显强于对照组。 **结论:** DBP 干预大鼠生殖结节中 Akt 信号通路及其下游 NF- κ B 的正常表达, 进而影响了上皮细胞增殖、凋亡及尿生殖褶的融合, 这可能是尿道下裂发生的机制之一。

[关键词] 邻苯二甲酸二丁酯; 尿道下裂; 生殖结节; Akt 信号通路

[中图分类号] R695

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-626-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20130512

Differential expression of Akt signaling pathway in the hypospadiac male fetal rats induced by dibutyl phthalate

Li Shouchun^{1,2}, Zhang Lifeng², Zuo Li², Zhou Zhongxing², Zhang Wei^{1*}

(¹Department of Urology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Urology, Changzhou No 2 People's Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213004, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the differential expression of Akt signaling pathway in the genital tubercle (GT) of hypospadiac Spraque-Dawley rats induced by maternal exposure to dibutyl phthalate (DBP) and the control rats in order to further explore the mechanism of hypospadias. **Methods:** Twenty pregnant rats were randomly divided into two groups and administered with DBP at a dosage of 800 mg/kg or soybean oil intragastrically from gestation day (GD)14 to GD18. On GD19, the expression of Akt signaling pathway was analyzed by Western blot and immunohistochemistry. **Results:** The expression of phosphorylated Akt (p-Akt), Akt and NF- κ B had statistical difference between hypospadiac fetal rats and control ($P < 0.05$). The p-Akt was mainly located in the cytoplasm of epithelium; the staining intensity in the hypospadiac fetal rats was stronger than that in the control rats. **Conclusion:** Maternal exposure to DBP could increase the expression of Akt signaling pathway in GT epithelium, affect cellular proliferation, apoptosis and urethral fold fusion, and then result in the occurrence of hypospadias.

[Key words] dibutyl phthalate; hypospadias; genital tubercle; Akt signaling pathway

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 626-629]

[基金项目] 国家自然科学基金(30872596)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zwnjdoc@163.com

邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)是广泛应用于工业生产的重要有机化合物, 主要用于增塑剂、有机溶剂、胶粘剂和农药载体等。目前在大

气、水体、土壤等环境介质中均可检测到该类化合物的存在^[1-2],其对雄性生殖系统等的生物毒性已受到全球性关注。以往对 DBP 生殖毒性机制的研究大多集中于 DBP 对睾丸组织结构和功能的损害,以及 DBP 对睾酮代谢有关的一些关键酶的影响^[3-8],然而对于 DBP 在胎鼠生殖结节发育过程中分子机制的研究不够深入。本研究在已经构建的 DBP 诱导尿道下裂大鼠模型的基础上^[9],研究此模型中 Akt 信号通路及其下游关键蛋白核转录因子 κ B(nuclear factor- κ -gene binding, NF- κ B) 在胎鼠生殖结节中的差异表达,探讨 DBP 在诱导尿道下裂发生过程中的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

DBP(分析纯,比重 1 g/ml)购自美国 Sigma 公司,兔抗 Akt、p-Akt 多克隆抗体购自美国 SAB 公司,兔抗 NF- κ B 和鼠抗 β -actin 多抗购自美国 Abcam 公司,羊抗兔 IgG、EDTA 抗原修复液、多聚赖氨酸、抗体稀释液、细胞裂解液、进口羊血清工作液、浓缩 DAB 试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自北京中衫金桥。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药方式

8 周龄 SPF 级 SD 大鼠,雌性 20 只,体重(260 ± 10)g,雄性 20 只,体重(300 ± 20)g,购于南京医科大学实验动物中心。经适应性饲养 1 周后,按雌雄比例 1:1 于下午 5 时合笼。次晨检查雌鼠阴道,有阴栓雌鼠分笼喂养,当天记为妊娠时间(gestation day, GD)0 d(GD0)。将孕鼠随机分为染毒组和对照组,每组各 10 只。自 GD14~GD18,每天上午 9 时予以灌胃,染毒组予 DBP 800 mg/(kg·d),对照组予大豆油,灌胃容积为 5 ml/(kg·d)。

1.2.2 取材

在 GD19 时,将染毒组孕鼠脱臼处死后取出胎鼠,根据内外生殖器鉴别出雌雄及尿道下裂胎鼠。提取尿道下裂胎鼠生殖结节组织,随机分两部分,一部分放入液氮行 Western blot 检测,另一部分放于固定液保存行免疫组化染色。对照组同样处理。

1.2.3 Western blot

按说明书对所取尿道下裂胎鼠与对照胎鼠的生殖结节组织进行裂解,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,2 组蛋白上样量均为 50 μ g,10 mA 恒流电泳,约 90 min。半干电转仪恒流 40 mA,转移 2 h,根据蛋白

Marker 的指示位置将 PVDF 膜剪开,分别加一抗(兔抗大鼠 Akt、p-Akt,1:1 000 稀释;兔抗大鼠 NF- κ B,1:1 000 稀释;小鼠抗大鼠 β -actin,1:4 000 稀释),4℃孵育过夜,TBS 洗膜后分别加入二抗(HRP-羊抗兔 IgG,1:1 000 稀释;HRP-羊抗小鼠 IgG,1:1 000 稀释),37℃孵育 1 h,洗膜后进行 ECL 化学发光、曝光、显影,用 ImageMaster 2D Platinum Software (Version 5.0) 图像分析软件对各条带的灰度值进行分析比较,以 Akt、p-Akt、NF- κ B 与对应内参 β -actin 的灰度值之比作为各自的相对表达量。上述结果重复 3 次。

1.2.4 免疫组化染色

生殖结节组织常规包埋、切片、脱蜡至水;3% H₂O₂ 室温 30 min 以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗;将切片浸入 1/50 EDTA 抗原修复液,微波加热 10 min,取出室温下放置 30 min 至基本冷却;0.01 mol/L PBS 漂洗后滴加羊血清工作液,置于保湿盒中室温封闭 2 h;直接滴加一抗兔抗大鼠 p-Akt (1:100),4℃孵育过夜;滴加二抗羊抗兔 HRP-IgG (1:1 000),室温下 1 h,以上 2 步均需 0.01 mol/L PBS 漂洗;DAB 显色,自来水终止显色;苏木素轻度复染;脱水,透明后树脂封片。用 0.1 mol/L PBS(pH7.4)代替一抗作为阴性对照,显微镜下观察染色强度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较用 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DBP 对胎鼠生殖结节发育的影响

染毒组尿道下裂胎鼠尿道口开口于阴茎腹侧,肛门生殖器距离(AGD)与正常对照组胎鼠相比明显缩短($P < 0.05$,表 1)。

2.2 DBP 对雄性胎鼠生殖结节中 Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

运用图像分析软件对 Western blot 结果进行分析后显示:尿道下裂与对照雄性胎鼠中 p-Akt、Akt、NF- κ B 蛋白相对表达量的比值分别为 3.057 ± 0.026、2.624 ± 0.073 和 3.524 ± 0.035,2 组之间存在着显著的统计学差异($n = 10, P < 0.05$,图 1)。在尿道下裂胎鼠中,p-Akt 蛋白在总蛋白中所占的比例为 0.403 ± 0.036;对照组中 p-Akt 蛋白所占的比例为 0.318 ± 0.029,尿道下裂胎鼠 p-Akt 蛋白相对表达量高于对照组($n = 10, P < 0.05$)。

表1 DBP 染毒组和对照组大鼠相关参数

Table 1 Parameters of rats between the DBP-exposed and control group

相关参数	染毒组	对照组
孕鼠(n)	10	10
雄性胎鼠(n)	41	52
雄性胎鼠 AGD(mm)	2.61 ± 0.17*	3.78 ± 0.22
出生体重(g)	5.01 ± 0.32*	6.68 ± 0.51
尿道下裂胎鼠(n)	18*	0
尿道下裂发生率(%)	43.9*	0

与对照组比较, *P < 0.05。

2.3 p-Akt 在胎鼠生殖结节组织中的免疫组化分析
在 GD19 的胎鼠生殖结节中, p-Akt 主要定位于尿道上皮细胞的胞质中, 与正常对照胎鼠相比, 尿道下裂胎鼠染色强度稍强(图 2), 与 Western blot 结果一致。

3 讨论

尿道下裂是一种尿道开口从阴茎头顶端移位至阴茎腹侧、阴囊及会阴的先天发育畸形^[10]。DBP 是公认的环境内分泌干扰物, 不但能引起大鼠肝肿大、肝细胞过氧化物酶体增多, 而且还具有胚胎毒性, 可诱

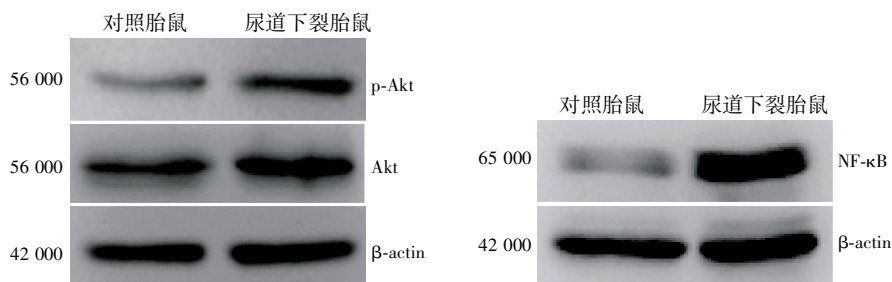


图1 p-Akt、Akt、NF-κB 在 GD19 雄性胎鼠生殖结节中的表达

Figure 1 Protein expressions of p-Akt, Akt and NF-κB in the genital tubercle of fetal rats on GD19

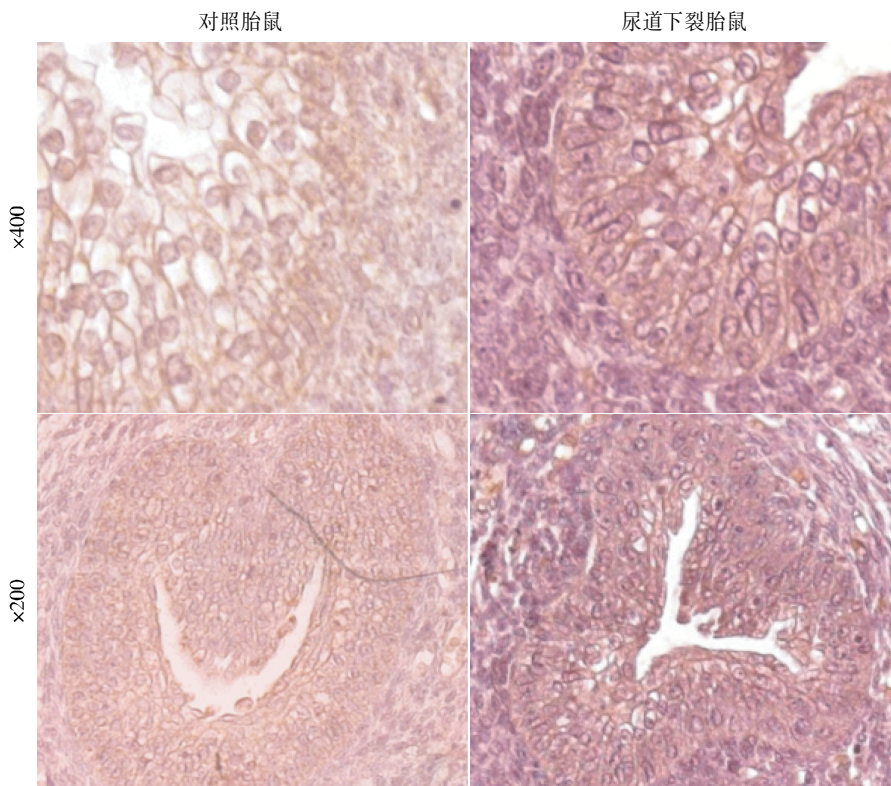


图2 p-Akt 在 GD19 雄性胎鼠生殖结节中的定位分析

Figure 2 Immunohistochemical staining of p-Akt in the fetal genital tubercle on GD19

导尿道下裂, 精子数量减少等雄性生殖系统的损害。人群病例对照的研究发现^[11], 职业暴露 DBP 类化合

物和喷发剂是尿道下裂发生的高危因素, 提示环境中 DBP 暴露可能对人类泌尿生殖系统有直接危害。

本实验在雄鼠生殖系统发育关键时期采用 DBP 灌胃染毒的方式建立了稳定的尿道下裂大鼠模型。同时运用 Western blot 检测 GD19 胎鼠生殖结节组织中 Akt 信号通路及其下游关键蛋白的表达水平。结果尿道下裂组 p-Akt、NF- κ B 的表达较对照组均有明显上调。通过免疫组化分析显示, p-Akt 主要定位于尿道上皮细胞的胞质中。

Akt 是细胞质中一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 非磷酸化 Akt 不具备生物学活性, 其必须经过磷脂酰肌醇-3 激酶 (phos-phoinositide 3-kinase, PI3K)/Akt 信号途径激活成为磷酸化 Akt (p-Akt) 后才能作用于各种下游分子, 在调节糖代谢、介导细胞生长与增殖、促进蛋白质合成、抑制细胞凋亡等方面起着重要作用。其中, NF- κ B 是 Akt 重要的下游分子之一。既往对 Akt 信号通路的研究集中在肿瘤方面^[12], 认为 Akt 的激活与肿瘤的恶性程度和转移进展有关, p-Akt 可以干预肿瘤细胞凋亡, 导致肿瘤细胞存活和过度增殖, 在肿瘤细胞恶性行为中发挥作用^[13]。既往有文献表明, Akt 信号通路受到抑制, 即 Akt 的磷酸化受干扰后, 将会导致雄激素受体的表达下调^[14], 然而这只是在针对前列腺癌的研究中得出的结论。近年来也有研究证实, 在 DBP 诱导的尿道下裂大鼠中雄激素水平是下降的^[15], 而本研究结果表明, Akt 信号通路在 DBP 诱导的尿道下裂胎鼠生殖结节发育过程中同样具有重要作用, 提示 DBP 染毒后可能通过激活 Akt 信号通路来降低胎鼠体内雄激素水平, 从而促进了尿道下裂的发生。DBP 染毒后对雄性胎鼠具有直接的毒性作用, 干预了生殖结节发育过程中 Akt 信号通路, 进而干扰上皮细胞的正常分化、增殖和凋亡, 并妨碍尿生殖褶的融合, 影响了雄性仔鼠生殖结节的发育, 这可能是导致尿道下裂的重要原因之一。

[参考文献]

- [1] Watanabe T. Determination of dialkyl phthalates in high altitude atmosphere for validation of sampling method using a helicopter[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2001, 66(4):456-463
- [2] Lubick N. Running phthalates to ground: pinpointing exposure sources in a virtual home[J]. Environ Health Perspect, 2010, 118(2):A80
- [3] Barlow NJ, Phillips SL, Wallace DG, et al. Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl)phthalate[J]. Toxicol Sci, 2003, 73(2):431-441
- [4] 朱英坚, 蒋君涛, 马 隆, 等. 邻苯二甲酸二丁酯干预 Fgfs 信号通路致雄性仔鼠尿道下裂发生的分子机制研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2009, 29(7): 949-952
- [5] Zhang W, Shen H, Ma L, et al. Differential expression of peroxiredoxin 6 in fetal rat testis following in utero exposure to di(n-butyl) phthalate [J]. Toxicology, 2007, 240(1-2):86-95
- [6] Clewell RA, Kremer JJ, Williams CC, et al. Kinetics of selected di-n-butyl phthalate metabolites and fetal testosterone following repeated and single administration in pregnant rats[J]. Toxicology, 2009, 255(1-2):80-90
- [7] Rider CV, Furr JR, Wilson VS, et al. Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt common target tissues via diverse mechanisms of toxicity[J]. Int J Androl, 2010, 33(2):443-462
- [8] Johnson KJ, Heger NE, Boekelheide K. Of mice and men (and rats): phthalate-induced fetal testis endocrine disruption is species-dependent[J]. Toxicol Sci, 2012, 129(2):235-248
- [9] 魏云飞, 常俊锴, 冯宁翰, 等. Lamin B1 在邻苯二甲酸二丁酯致大鼠尿道下裂发生中的表达变化[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2010, 30(7):928-931
- [10] Baskin LS, Ebbers MB. Hypospadias: anatomy, etiology, and technique[J]. J Pediatr Surg, 2006, 41(3):463-472
- [11] Giordano F, Abballe A, De Felip E, et al. Maternal exposures to endocrine disrupting chemicals and hypospadias in offspring [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010, 88(4):241-250
- [12] Sethi G, Ahn KS, Sung B, et al. Pinitol targets nuclear factor-kappa B activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(6):1604-1614
- [13] Furuya F, Lu C, Guigon CJ, et al. Nongenomic activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by thyroid hormone receptors[J]. Steroids, 2009, 74(7):628-634
- [14] Li Y, Wang Z, Kong D, et al. Regulation of Akt/FOXO3a/GSK-3beta/AR signaling network by isoflavone in prostate cancer cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(41):27707-27716
- [15] Zhu YJ, Jiang JT, Ma L, et al. Molecular and toxicologic research in newborn hypospadiac male rats following in utero exposure to di-n-butyl phthalate (DBP)[J]. Toxicology, 2009, 260(1-3):120-125

[收稿日期] 2012-12-21