

蓬乱蛋白在尿道下裂包皮中的表达

曹国锋, 戚 华

(南通大学附属医院小儿外科, 江苏 南通 226001)

[摘要] 目的:研究蓬乱蛋白(dishevelled,DVL)-1、DVL-3 在正常和尿道下裂患儿包皮组织中的表达,探讨其在尿道下裂发病机制中可能发挥的作用。方法:收集拟行尿道下裂尿道修复术患儿术中切除的包皮组织(24 例)和门诊包皮环切术中切除的包皮(24 例),采用免疫组化和实时定量聚合酶链反应(qPCR)方法检测两组包皮中 DVL-1、DVL-3 mRNA 和蛋白质的表达情况。结果:尿道下裂患儿包皮组织中 DVL-1、DVL-3 mRNA 表达较正常水平有显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。DVL-1、DVL-3 蛋白主要表达在包皮皮下间充质细胞层,其中 DVL-1、DVL-3 蛋白在尿道下裂患儿包皮组织的表达较正常对照有明显增强趋势。结论:DVL-1、DVL-3 的表达异常与尿道下裂发生有关,其介导的调控异常可能是导致尿道下裂发生的主要机制之一。

[关键词] 尿道下裂;蓬乱蛋白;聚合酶链反应

[中图分类号] R695

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1561-03

doi:10.7655/NYDXBNS20151113

尿道下裂是男性生殖器最常见的畸形,新生儿发病率为 0.5%~2.0%,并呈逐年上升趋势^[1-3]。该畸形主要表现为阴茎腹侧包皮和尿道的环形闭合障碍,导致尿道开口异位于阴茎腹侧,甚至阴囊和会阴区。目前手术矫治是其唯一的治疗方法,但是,任何一种矫治方式均会有并发症并可能造成患儿心理阴影。为此,有必要澄清尿道下裂的原因。通过最新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包含丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)成员,c-jun 氨基末端激酶(JNK)正是 MAPK 中重要的一员。蓬乱蛋白(dishevelled,DVL)是一种胞质蛋白,在胚胎发育、细胞分化和肿瘤形成过程中起重要作用^[4-6]。DVL 是 Wnt 信号通路中关键调节分子,它通过经典 Wnt 途径和非经典 Wnt 途径调控 JNK 表达。目前,一共鉴定出 3 个人类同源 DVL 蛋白亚基因,分别为 DVL-1、DVL-2、DVL-3,其中 DVL-1、DVL-3 参与胚胎发育,在胚胎发育中至关重要。本研究将探索 DVL-1、DVL-3 在正常和尿道下裂患儿包皮组织中的表达,探讨其在尿道下裂发病机制中可能发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究收集了南通大学附属医院行尿道下裂尿道修复术患儿术中切除的包皮组织(均为阴茎远端包皮)24 例为尿道下裂组,年龄 2~7 岁,平均 3.5 岁,所

有病例均为首次手术矫治患儿,无其他合并畸形,无染色体疾病。同时设立正常对照组:为本院小儿外科门诊拟行包皮环切术儿童术中切除的包皮组织(均为阴茎远端包皮),共 24 例,年龄 4~5 岁,平均 3.5 岁,基本上与尿道下裂组年龄匹配。本研究得到医院伦理委员会批准,每次取材均通过患儿家长或监护人的知情同意。

兔二步法检测试剂盒(3%双氧水)、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),封闭用山羊血清工作液(北京康为世纪生物技术有限公司),兔抗人 DVL-1 蛋白抗体(Sigma-Aldrich 公司,美国),兔抗人 DVL-3 蛋白抗体(BioVision Incorporated,美国),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)。

1.2 方法

1.2.1 标本的制备

每位患儿的包皮组织标本均用无菌生理盐水将血迹洗去,分为 2 份。1 份立即置于液氮冻存,另 1 份用 4%多聚甲醛溶液固定 48 h。

1.2.2 RNA 提取和实时聚合酶链反应(qPCR)

从液氮中取出包皮组织,遵照试剂盒说明书提取和测量总 RNA 量,分光光度仪上 260 nm 波长下测量其浓度和纯度,然后进行逆转录和 qPCR 反应,建立稳定、高重复性的标准曲线,参照内参的表达

检测和计算 DVL-1、DVL-3 mRNA 在两组包皮组织中的相对表达量。每个 cDNA 样本重复检测 3 次(表 1)。

表 1 引物序列、产物大小及退火温度

基因名称	序列(5'→3')	片段长度(bp)	退火温度(°C)
DVL-1	F:GCTGACGGTGAAGAGTGAC	108	55
	R:GCATTGGCGATGGTGAT		
DVL-3	F:CGCAAGTATGCCAGCAAC	102	53
	R:GCAGAGGTCACCGAAGAT		
β-actin	F:AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	184	59
	R:AGCACTGTGTTGGCGTACAG		

1.2.3 免疫组织化学

将固定好的组织常规脱水、浸蜡、包埋。5 μm 连续切片黏附于防脱载玻片上,60 °C 恒温干燥箱中烘烤过夜(>12 h)。经脱蜡水化后,0.01 mol/L 枸橼酸盐溶液微波抗原修复 15 min,自然冷却至室温;3%双氧水液和山羊血清先后于室温下封闭 15 min,甩去多余封闭液后,立即滴加稀释的一抗(抗 DVL-1、DVL-3 抗体,1:200 稀释),湿盒中 4°C 过夜。滴加兔二抗检测试剂,37°C 孵育 30 min,滴加新鲜配置的 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间,苏木素染核 30 s,晾干,中性树胶封片,苏木素和伊红染色(HE)是在切片脱蜡水化后,先后进行苏木素染核(7 min)和伊红染细胞质(1 min)。

1.3 统计学方法

实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,利用 SPSS17.0 统计软件分析,组间比较采用年龄配对设计的两样本 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征

24 例尿道下裂患儿包皮标本,其中龟头型 1 例,冠状沟及沟下型 4 例,阴茎体型 6 例,阴茎根型 8 例,阴囊型 4 例,会阴型 1 例。

2.2 正常组和尿道下裂组包皮组织中 DVL-1、DVL-3 mRNA 的表达情况

DVL-1 和 DVL-3 mRNA 在正常对照包皮组织中相对表达量分别是 0.64 ± 0.05 和 0.75 ± 0.23 ,在轻中型尿道下裂患儿包皮组织中的相对表达量是 1.13 ± 0.18 和 1.23 ± 0.33 ,在重型尿道下裂患儿包皮组织中的相对表达量分别是 1.24 ± 0.15 和 1.31 ± 0.24 ,DVL-1 和 DVL-3 在尿道下裂患儿包皮组织中的表达较正常对照升高显著,差异有统计学意义($P < 0.05$),轻中型和重型尿道下裂患儿包皮组织中的表

达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 正常组和尿道下裂组包皮组织中 DVL-1、DVL-3 蛋白的表达情况

免疫组织化学检测发现 DVL-1 和 DVL-3 蛋白在尿道下裂组和正常组包皮组织中的表达主要分布于皮下间充质细胞层的胞核和胞浆(棕黄色视为阳性表达),DVL-1、DVL-3 蛋白在尿道下裂组包皮中的表达较正常组有显著增强趋势(图 1)。

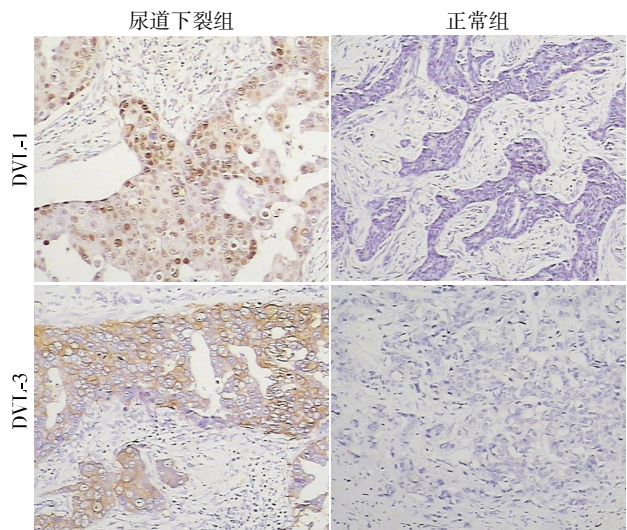


图 1 DVL-1、DVL-3 在正常和尿道下裂包皮组织中的表达(免疫组化,×400)

3 讨论

关于 DVL 功能的研究多集中在肿瘤、应激反应以及损伤修复等发生过程的调控。目前还没有 DVL 表达与人类先天性泌尿生殖畸形相关性的报道。因此,通过对已知 DVL 功能的推测来解释和提供 DVL 表达与尿道下裂之间关系的证据显得很有必要。

男性生殖器的形成,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的方式有条不紊地进行^[7]。研究发现在人类阴茎发育过程中,存在尿道襞融合形成尿道上皮缝以及随后的尿道缝重塑过程^[8],任何影响尿道缝形成和重塑的因素均有可能导致尿道下裂。Baskin 等^[8]研究认为尿道上皮缝重塑是通过细胞迁移到达腹侧尿道中部取代残余上皮细胞实现的,其中由间充质细胞取代上皮细胞。

Wnt 信号通路与其他信号通路特别是 MAPK 信号通路之间的相互作用成为近年研究热点,DVL 是机体组织细胞中广泛存在的胞质蛋白,属于信号转导蛋白,具有多功能和进化上高度保守的特

点,目前更多研究认为 DVL-1、DVL-3 与胚胎发育关系密切^[9-10]。

Wnt 信号通路与其他信号通路特别是 MAPK 信号通路之间的相互作用成为近年研究热点。DVL 是 Wnt 信号通路中的关键调节分子之一,主要通过经典 Wnt 信号途径和非经典 Wnt 信号途径发挥生物学功能^[11]。一方面细胞核内 DVL 与经典 Wnt 信号通路中 β -catenin 相互作用,影响下游重要信号传递蛋白 JNK 形成;另一方面 DVL 在非经典 Wnt(CRP)通路中通过小 G 蛋白激活 JNK 来调控细胞骨架重排。

JNK 激酶是 MAPK 超家族的一员,以 JNK 为中心信号通路可被细胞因子、生长因子、应激等多种因素激活,JNK 在多种细胞的迁移中扮演重要角色,在更多系统中发现 JNK 活化跟细胞迁移增强有关。雄激素代谢通路的遗传缺陷会导致尿道下裂畸形。JNK 通过干扰雄激素受体的正常代谢,抑制间充质细胞向上皮细胞的迁移,从而影响尿道正常的环形闭合,导致尿道下裂畸形发生。

本研究发现,DVL-1、DVL-3 蛋白表达在包皮皮下间充质细胞层,且在尿道下裂患儿表达超过正常对照水平,提示在尿道形成过程中,DVL 的过表达跟尿道缝上皮间充质细胞的迁移有关。据此本文推测,人尿道发育过程中出现细胞迁移异常时,出现了以 JNK 为中心信号通路的链锁反应,可能通过经典与非经典 Wnt 信号通路促使 DVL-1 和 DVL-3 表达上调,试图使间充质细胞取代上皮细胞,修复细胞迁移异常,从而形成正常尿道。

在本研究中,因为研究人群的局限以及病例数的不太充分可能削弱我们这一推断的说服力,因此,更大样本量、更加深入的研究很有必要:包括使用尿道下裂动物模型的研究,以及验证 DVL 体外调节阴茎间充质细胞的迁移等,将会更好地解释 DVL

在单纯性尿道下裂发病机制中的作用。

[参考文献]

- [1] Huang WY, Chen YF, Guo YJ, et al. Epidemiology of hypospadias and treatment trends in Taiwan; a nationwide study[J]. *J Urol*, 2011, 185(4): 1449-1454
- [2] 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
- [3] Elliott CS, Halpern MS, Paik J, et al. Epidemiologic trends in penile anomalies and hypospadias in the state of California, 1985-2006[J]. *J Pediatr Urol*, 2011, 7(3): 294-298
- [4] Almuedo-Castillo M, Sal E, Adell T. Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians[J]. *Proc Natl Sci Acad*, 2011, 108(7): 2813-2818
- [5] Zhang X, Zhu J, Yang GY, et al. Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(7): 743-754
- [6] Pulvirenti T, Van Der Heijden M, et al. Dishevelled 2 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity in human gliomas[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(23): 7280-7290
- [7] Kalfa N, Sultan C, Baskin LS. Hypospadias: etiology and current research[J]. *Urol Clin North Am*, 2010, 37(2): 159-166
- [8] Baskin LS, Erol A, Jegatheesan P, et al. Urethral seam formation and hypospadias[J]. *Cell Tissue Res*, 2001, 305(3): 379-387
- [9] Long JM, LaPorte P, Paylor R, et al. Expanded characterization of the social interaction abnormalities in mice lacking Dvl1[J]. *Genes Brain Behav*, 2004, 3(1): 51-62
- [10] Tsang M, Lijam N, Yang Y, et al. Isolation and characterization of mouse dishevelled-3[J]. *Dev Dyn*, 1996, 207(3): 253-262
- [11] Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled; an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity[J]. *Development*, 2005, 132(20): 4421-4436

[收稿日期] 2015-03-29