

雄激素受体干预对包皮成纤维细胞 Mafb 基因表达的影响

王 绍,周 玥,向 涵,刘 星,沈炼桔,龙春兰,张德迎,何大维,林 涛,魏光辉

(重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科、儿童泌尿生殖发育与组织工程重庆市重点实验室、

儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、

儿科学重庆市重点实验室,重庆 400014)

【摘要】目的:探讨双氢睾酮(dihydrotestosterone,DHT)与氟他胺(flutamide,Flu)对 Mafb 基因表达的影响。**方法:**利用原代培养的正常儿童包皮成纤维细胞株,分别采取不同浓度 DHT 与 Flu 干预,通过 RT-PCR、免疫细胞荧光和 Western blot 检测 Mafb 的转录表达情况。**结果:**在 DHT 浓度为 3.0×10^{-8} mol/L 与 3.0×10^{-6} mol/L 干预条件下,Mafb mRNA 的表达量分别为 0.372 ± 0.003 、 0.594 ± 0.045 ,与正常组(0.444 ± 0.007)相比,DHT 3.0×10^{-6} mol/L 组明显上调($P=0.005$),而 DHT 3.0×10^{-8} mol/L 组上调差异不明显($P=0.145$);Flu 15 μ mol/L 干预条件下,Mafb mRNA 的表达量为 0.221 ± 0.013 ,与正常组相比,表达量明显下降($P=0.000$)。细胞免疫荧光分析表明,与正常对照组相比(0.027 ± 0.006),DHT 3.0×10^{-8} mol/L 组(0.046 ± 0.004)、 3.0×10^{-6} mol/L 组(0.076 ± 0.003)Mafb 表达量明显上调($P=0.010$, $P=0.000$),而 Flu 组(0.006 ± 0.002)明显下调($P=0.009$)。同样 Western blot 结果显示,较对照组蛋白水平(0.163 ± 0.001)相比,DHT 3.0×10^{-8} mol/L 组(0.146 ± 0.001)上调无统计学差异($P=0.960$),DHT 3.0×10^{-6} mol/L 组(0.598 ± 0.087)Mafb 表达量上调差异有统计学意义($P=0.000$),而 Flu 组(0.066 ± 0.002)明显下调($P=0.040$)。**结论:**在体外培养包皮成纤维细胞株中,Mafb 基因的表达受 DHT 和 Flu 的调控。Mafb 作为雄激素受体下游调控蛋白,可能是雄激素受体信号通路促进尿道发育的重要机制。

【关键词】Mafb;双氢睾酮;氟他胺;成纤维细胞**【中图分类号】**R726.9**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-03-27

Effects of androgen receptor treatment on the expression of the Mafb gene in foreskin fibroblasts

Wang Shao,Zhou Yue,Xiang Han,Liu Xing,Shen Lianju,Long Chunlan,

Zhang Deying,He Dawei,Lin Tao,Wei Guanghui

(Department of Urology,Children's Hospital of Chongqing Medical University;Chongqing Key Laboratory of Children Urogenital Development and Tissue Engineering;Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders;China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders;Chongqing Key Laboratory of Pediatrics)

【Abstract】Objective:To explore the effects of dihydrotestosterone (DHT) and flutamide (Flu) on the gene expression of Mafb. **Methods:**Primarily cultured normal foreskin fibroblasts from children were treated with different concentrations of DHT and Flu,and then were tested for the transcription and expression of Mafb using RT-PCR,cellular immunofluorescence,and Western blot. **Results:** After treatment with DHT at concentrations of 3.0×10^{-8} mol/L and 3.0×10^{-6} mol/L,the mRNA expression of Mafb was significantly up-regulated in the DHT 3.0×10^{-6} mol/L group(0.594 ± 0.045 vs. 0.444 ± 0.007 , $P=0.005$),but not significantly up-regulated in the DHT 3.0×10^{-8} mol/L group(0.372 ± 0.003 vs. 0.444 ± 0.007 , $P=0.145$),as compared with that in the normal group. After treatment with 15 μ mol/L Flu,the mRNA expression of Mafb was significantly reduced compared with that in the normal group(0.221 ± 0.013 ,

$P=0.000$). Cellular immunofluorescence assay showed that the expression of Mafb was significantly up-regulated in the DHT 3.0×10^{-8} mol/L group and the DHT 3.0×10^{-6} mol/L group (0.046 ± 0.004 and 0.076 ± 0.003 ,respectively, $P=0.010$ and 0.000 ,respectively),but significantly down-regulated in the Flu group(0.006 ± 0.002 , $P=0.009$),as compared with that in the

作者介绍:王 绍,Email:13500346552@163.com,

研究方向:小儿泌尿生殖畸形。

通信作者:刘 星,Email:LiuX-0217@163.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:81370782);重庆医科大学附属儿童医院临床研究资助项目(编号:lcjy2015-5)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190603.1624.034.html
(2019-06-04)

normal control group(0.027 ± 0.006). Similarly, Western blot results showed that the protein expression of Mafb was not significantly up-regulated in the DHT 3.0×10^{-8} mol/L group(0.146 ± 0.001 , $P=0.960$), but was significantly up-regulated in the DHT 3.0×10^{-6} mol/L group(0.598 ± 0.087 , $P=0.000$), while the expression was significantly down-regulated in the Flu group(0.066 ± 0.002 , $P=0.040$), as compared with that in the control group(0.163 ± 0.001). **Conclusion:** In the foreskin fibroblasts cultured in vitro, the gene expression of Mafb is regulated by DHT and Flu. Mafb, as a downstream regulatory protein of androgen receptor, may be an important mechanism in the androgen receptor signaling pathway to promote urinary tract development.

[Key words] Mafb; dihydrotestosterone; flutamide; fibroblast

尿道下裂是儿童泌尿生殖系统最常见的畸形之一,其国内外的流行病学调查发病率为 1:300~1:200,并有逐年上升趋势^[1-2]。尿道下裂的主要临床表现为尿道开口的异常伴阴茎下弯畸形,阴茎背侧的包皮堆积,对儿童的心理、健康,成年后的生育能力有很大影响^[2]。目前对于大部分的尿道下裂病因不明,但是主流观点认为跟遗传易感性和环境内分泌干扰物有关^[3-4],这些因素会影响尿道的发育,最终导致这种畸形。

尿道的雄性化发育过程依赖于雄激素的作用,而雄激素或雄激素受体的异常将导致男性泌尿生殖器发育障碍^[5-6]。目前对于雄激素受体相关信号通路的研究仍是热点。肌腱膜纤维肉瘤基因 B 型(v-mafmusculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family protein B, Mafb)是 Maf 家族重要的成员,是一种碱性亮氨酸拉链 DNA 结合蛋白,是真核生物中保守性较高的一类核转录因子。研究发现它与细胞的增殖、分化、器官的发生密切相关^[7-10],也参与男性泌尿生殖器发育过程^[11],对它的机制研究较少。本研究拟通过原代培养的包皮成纤维细胞株,利用雄激素受体干预剂(双氢睾酮、氟他胺),研究其对 Mafb 表达情况的影响,探讨在男性泌尿生殖器发育过程中 Mafb 的调控机制,为尿道发育畸形的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料分组

1.1.1 细胞来源 正常儿童包皮环切术后获得包皮样本,参考成熟的提取方法,经原代培养包皮成纤维细胞,传代纯化后使用^[12]。取材经家属签字同意后获得。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清购于美国 Hyclone 公司,氟他胺(Flu)购于美国 Sigma 公司,DMEM 高糖培养基购于 Gibco,双氢睾酮(DHT)购于美国 MCE 公司, Mafb 多克隆抗体购于

英国 ABCOM 公司,AR 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司, Vimentin 多克隆抗体购于欣博盛公司,辣根标记山羊抗兔 IgG 抗体, DAB 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司, MTT 试剂盒购于碧云天生物技术研究。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 包皮组织取下后用无菌 PBS 清洗 3 次;后剪去皮下组织,将皮片用 0.25%胰蛋白酶于 4℃消化过夜;眼科剪机械分离表皮与真皮,将真皮用无菌 PBS 清洗 3 次,剪成 1 mm³的组织块;将组织块移入离心管中,加入 0.2% I 型胶原酶溶液吹打均匀, 37℃, 5%CO₂ 孵箱消化 4 h,经 200 目不锈钢滤网过滤消化液;用含 10%胎牛血清(FCS)的 DMEM 培养液重新悬浮细胞混匀后,接种于 T25 培养瓶,在 37℃、含 5%CO₂ 孵箱中培养,每 3 d 换培养液。待细胞长满 90%,传代纯化 3 次(P3)后使用。

1.2.2 MTT 法测定 Flu 和 DHT 干预浓度 取 96 孔板,每孔加入 100 μL 细胞悬液,调节细胞密度为 10 000 个/孔(边缘用 PBS 填充), 37℃, 5%CO₂ 孵育 24 h,待细胞完全贴壁。分别加入不同浓度(0 、 3.0×10^{-5} 、 3.0×10^{-6} 、 3.0×10^{-7} 、 3.0×10^{-8} 、 3.0×10^{-9} mol/L)DHT 培养基,每组设置 3 个平行组。同样地不同浓度(0 、 5 、 10 、 15 、 20 μmol/L)的 Flu 培养基,设 3 个平行组, 37℃, 5%CO₂ 孵育 72 h 后,加入 20 μL MTT(5 mg/L, 0.5%MTT),同样条件下孵育 4 h,常温下终止培养,无菌操作台小心吸去孔内培养基,每孔加入 80 μL 二甲基亚砜,置于摇床上低速振荡 15 min,使结晶物充分的溶解。在酶联免疫测量仪测量 490 nm 波长的吸光度。同时设置调零孔(无细胞培养基中加入 MTT 和二甲基亚砜)。根据成纤维细胞的最大吸光度确定 DHT 和氟他胺的最适细胞增殖浓度。

1.2.3 DHT 及 Flu 干预 取 24 孔板,放入无菌处理的细胞爬片,每孔接种约 10 000 个细胞,于 37℃, 5%CO₂ 孵育 24 h,待细胞完全贴壁。根据上一步 MTT 结果确定的最佳干预浓度,在 DHT 3.0×10^{-8} 、 3.0×10^{-6} mol/L, Flu 15 μmol/L 浓度下, 37℃, 5%CO₂ 孵育 72 h。

1.2.4 免疫细胞荧光 取上述条件下培养的爬片,无菌 PBS 轻轻漂洗 3 次后,用 4%多聚甲醛室温固定 15 min,再用无菌 PBS 轻洗 3 次,每次 10 min,用 0.1%TritonX-100 打孔 15 min 后用 PBS 洗 3 次,每次 10 min。5%山羊血清(PBS 稀

释)封闭 1 h。孵免抗人 Maf β /雄激素受体(androgen receptor, AR)/Vimentin 多克隆抗体(1:200 稀释),4 ℃冰箱孵育过夜。第 2 天室温放置 30 min,PBS 漂洗 10 min,共 3 次。避光条件下加入辣根标记山羊抗兔的 Cy3 IgG 抗体(1:200 稀释),室温孵育 1 h。PBS 漂洗 10 min,共 3 次,避光条件下加入Hoechst 染核 1 h。PBS 洗 3 次,每次 10 min,避光下滴加抗荧光淬灭剂封片,最后在 90 I 荧光显微镜下拍照。最后将 Maf β 3 次独立实验的细胞免疫荧光图片利用 Image J2X 软件进行光密度分析,所得结果统计分析。

1.2.5 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 取上述条件干预 72 h 的成纤维细胞,用无菌 PBS 洗 3 次后加入 1 mL 的 Trizol,按照 Trizol 试剂说明提取总的 mRNA,cDNA 合成参照逆转录试剂盒的操作程序进行。PCR 反应体系 12.5 μ L,反应条件:98 ℃预变性 2 min;98 ℃ 10 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 2 min。反应后取 10 μ L PCR 扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳,应用凝胶图像分析系统分析结果,目的基因的表达量=目的条带的光密度/内参条带的光密度。所用引物设计使用 Primer Primer 5.0 软件,引物序列见表 1。

表 1 Maf β 、GAPDH 基因扩增引物序列

名称	序列(5'-3')	引物长度 (bp)
Maf β	上游 AGCCCGACCGAACAGAAGACA	131
	下游 ACTGGGTGCGAGCCGATGAG	
GAPDH	上游 CTCCTCCGGGTGATGCTTTT	146
	下游 ACATGTAAACCATGTAGTTGAGGTC	

1.2.6 Western blot 取上述条件干预 72 h 的成纤维细胞,用无菌 PBS 洗 3 次后加入 100 μ L 的 RIPA 和 PMSF 的混合液(100:1),提取成纤维细胞的总蛋白,BCA 法测蛋白浓度后,以每孔 30 μ g/孔上样量加入 12%的 SDS-PAGE 进行电泳,电泳完毕后将蛋白转至 PVDF 膜(聚偏二氟乙烯膜)上,置于 5%的脱脂奶粉中室温封闭 1 h,TBST 漂洗 10 min,3 次,兔抗 Maf β mAb(1:1 000 稀释)4 ℃冰箱孵育过夜;第 2 天室温静置 30 min,TBST 漂洗 10 min,3 次,再用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔的 IgG 抗体(1:5 000 稀释),室温孵育 1 h;再TBST 漂洗 10 min,3 次,将等体积的化学发光显示 A,B 液混合,滴加在 PVDF 膜上,在 Western blot 显影仪上显影拍照。使用 Image J 2X 软件测算实验结果的灰度值,目的蛋白的表达量=目的条带的灰度值/内参条带的灰度值。

1.3 统计学处理

所有实验数据均用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,所有数值用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,其组间两两比较采用 LSD- t 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 包皮成纤维细胞的鉴定

取 P3 成纤维细胞,利用成纤维细胞标志物波形蛋白(Vimentin)进行细胞免疫荧光鉴定,结果显示 P3 代的细胞形态符合(图 1A、B),成纤维呈长梭状、栅栏状,荧光显示 P3 代成纤维细胞的纯度已经很高(图 1C)。

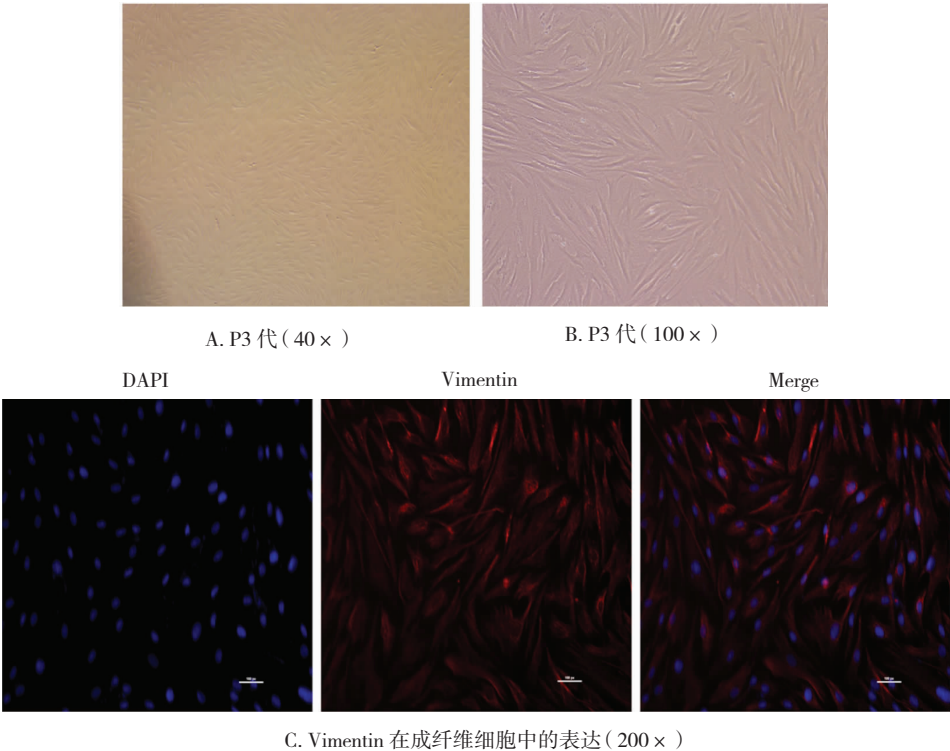


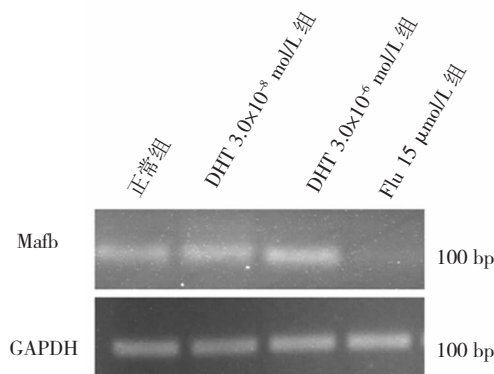
图 1 成纤维细胞的形态观察及鉴定

2.2 MTT 确定最佳干预浓度

在 DHT 浓度为 $0, 3.0 \times 10^{-9}, 3.0 \times 10^{-8}, 3.0 \times 10^{-7}, 3.0 \times 10^{-6}, 3.0 \times 10^{-5}$ mol/L 时, 72 h 的 MTT 值为 $0.124 \pm 0.019, 0.123 \pm 0.029, 0.116 \pm 0.022, 0.130 \pm 0.019, 0.154 \pm 0.041, 0.130 \pm 0.035$, 见表 2。由此可知 3.0×10^{-6} mol/L DHT 浓度下成纤维细胞的增殖水平最高, 确定为最佳的干预浓度。 3.0×10^{-8} mol/L 为儿童正常生理浓度范围, 作为另外一个干预浓度。在 Flu $0, 5, 10, 15$ μ mol/L 时, 72 h MTT 值为 $0.155 \pm 0.019, 0.058 \pm 0.006, 0.057 \pm 0.002, 0.056 \pm 0.003$, 见表 2。由此可知 15μ mol/L 时 MTT 值最低, 可作为一个合适干预浓度。

2.3 PCR 检测 Mafb mRNA 的表达

在 DHT 浓度为 3.0×10^{-8} mol/L 与 3.0×10^{-6} mol/L, Flu 15μ mol/L 干预条件下, 与正常组 (0.444 ± 0.007) 相比, Mafb mRNA 的表达量分别为 $0.372 \pm 0.003, 0.594 \pm 0.045, 0.221 \pm 0.013$, 方差分析 4 组的 Mafb mRNA 水平差异有统计学意义 ($F=43.730, P=0.000$)。与正常组相比, 但 DHT 3.0×10^{-6} mol/L 组明显上调 ($P=0.005$), 而 DHT 3.0×10^{-8} mol/L 组略微下调, 但差异无统计学意义 ($P=0.145$); Flu 15μ mol/L 干预条件下, Mafb mRNA 的表达量则表达量明显下降 ($P=0.0004$)。如图 2 及表 2 所示。



2.4 成纤维细胞中 AR 的检测

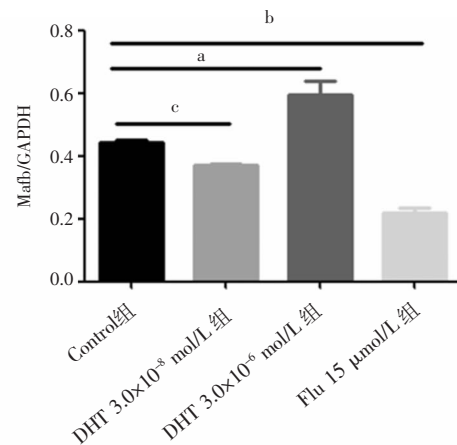
与正常组相比, DHT 3.0×10^{-6} mol/L 组能明显上调 AR 的表达, Flu 15μ mol/L 浓度组 AR 抑制明显, 如图 3 所示。

2.5 细胞免疫荧光

免疫荧光显示 Mafb 在各组成纤维细胞中都有表达, 定位为胞核与胞质中。与正常组 (0.027 ± 0.007) 的平均光密度相比, DHT 组浓度 3.0×10^{-8} mol/L 与 3.0×10^{-6} mol/L 与 Flu 15μ mol/L 组的平均光密度为 $0.046 \pm 0.004, 0.076 \pm 0.004, 0.006 \pm 0.002$, 各组方差分析有统计学差异 ($F=76.760, P=0.000$)。DHT 浓度 3.0×10^{-8} mol/L 组 Mafb 水平明显上调 ($P=0.010$), 高浓度 DHT 3.0×10^{-6} mol/L 组也明显上调 ($P=0.000$)。而 Flu 15μ mol/L 组下调明显 ($P=0.009$), 如图 4A、B 所示。

2.6 Western blot 检测

与对照组相比, DHT 3.0×10^{-8} mol/L 组和 DHT 3.0×10^{-6} mol/L 组的表达量增高, 而 Flu 组的表达量降低。对照组, 3.0×10^{-8} mol/L 组, DHT 3.0×10^{-6} mol/L 组和 Flu 15μ mol/L 组的蛋白表达水平分别为 $0.163 \pm 0.001, 0.146 \pm 0.001, 0.598 \pm 0.087, 0.025 \pm 0.010$, 经方差分析各组有统计学意义 ($F=56.960, P=0.000$)。与正常组比较, DHT 3.0×10^{-8} mol/L 组表达上调无统计学差异 ($P=0.960$), 但 DHT 3.0×10^{-6} mol/L 组上调差异有统计学意义 ($P=0.000$), 同样 Flu 15μ mol/L 组有统计学差异 ($P=0.040$), 如图 5 所示。



与正常组相比, a: $P=0.005$; b: $P=0.000$; c: 差异无统计学意义

图 2 各组 Mafb mRNA 的表达

表 2 在 DHT 与 Flu 干预条件下 Mafb mRNA 及蛋白表达水平

组别	Mafb mRNA 表达水平	Mafb 平均光密度值	Mafb 平均灰度值
正常组	0.444 ± 0.007	0.027 ± 0.007	0.163 ± 0.001
DHT 3.0×10^{-8} mol/L 组	0.372 ± 0.003^a	0.046 ± 0.004^b	0.146 ± 0.001^a
DHT 3.0×10^{-6} mol/L 组	0.594 ± 0.045^b	0.076 ± 0.004^b	0.598 ± 0.087^b
Flu 15μ mol/L 组	0.221 ± 0.013^b	0.006 ± 0.002^b	0.025 ± 0.010^b
F 值	43.730	76.760	56.960
P 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 与正常组相比, $P > 0.05$; b, 与正常组相比, $P < 0.05$

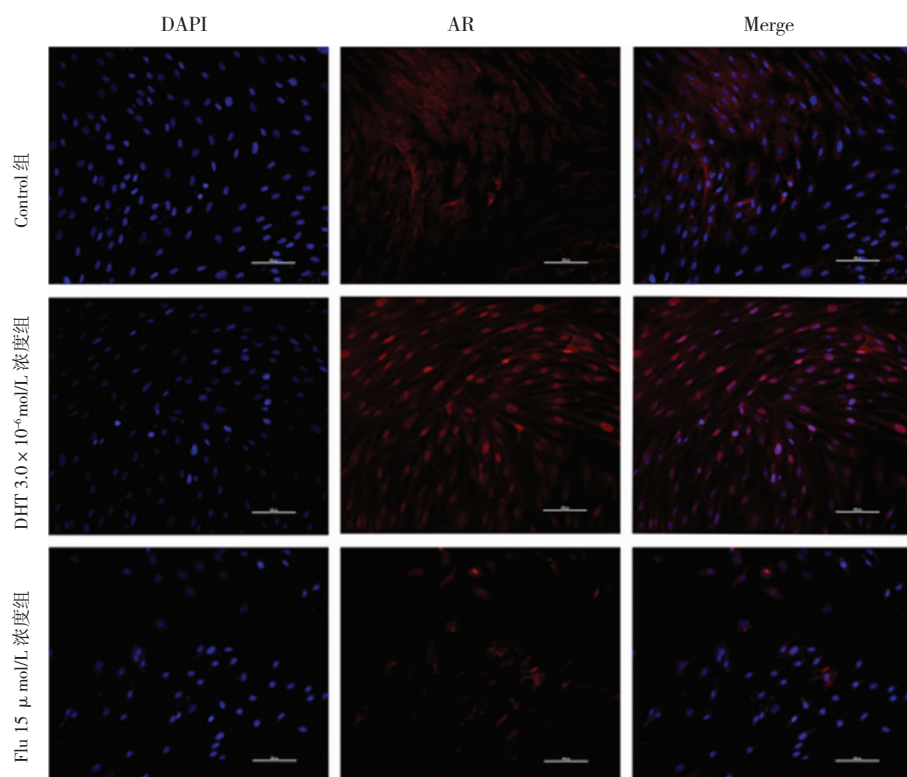
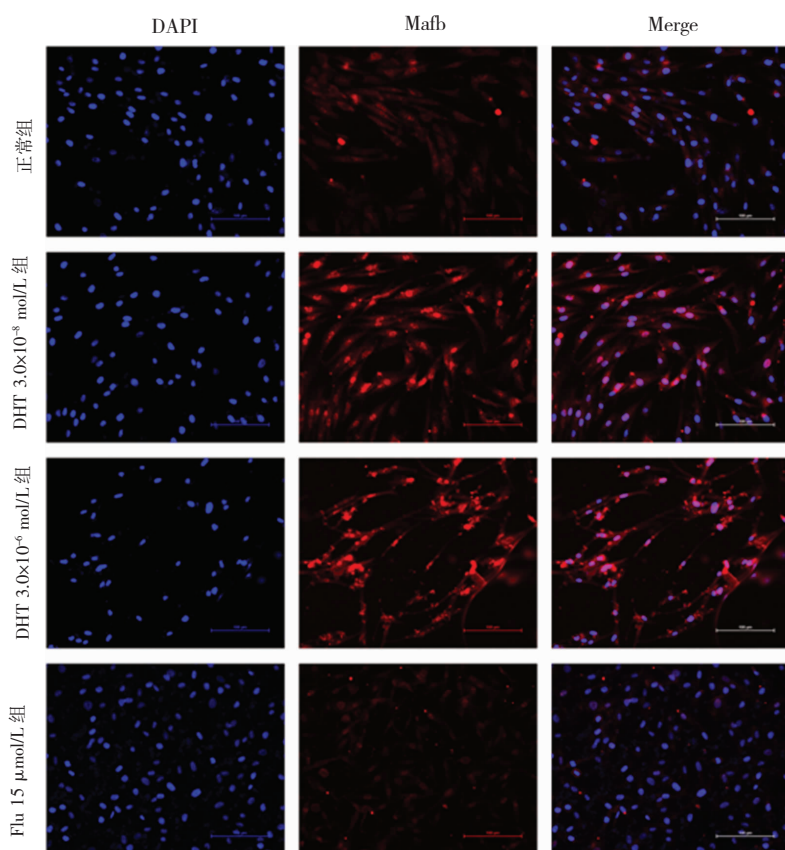
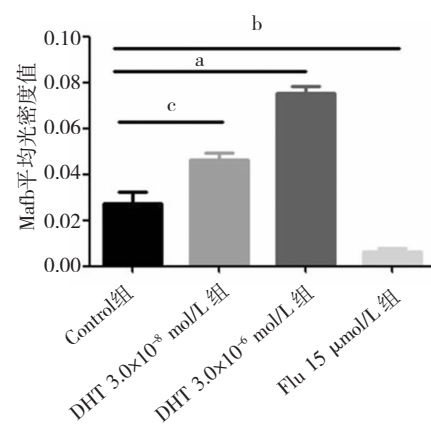


图 3 DHT、Flu 干预后 AR 的变化

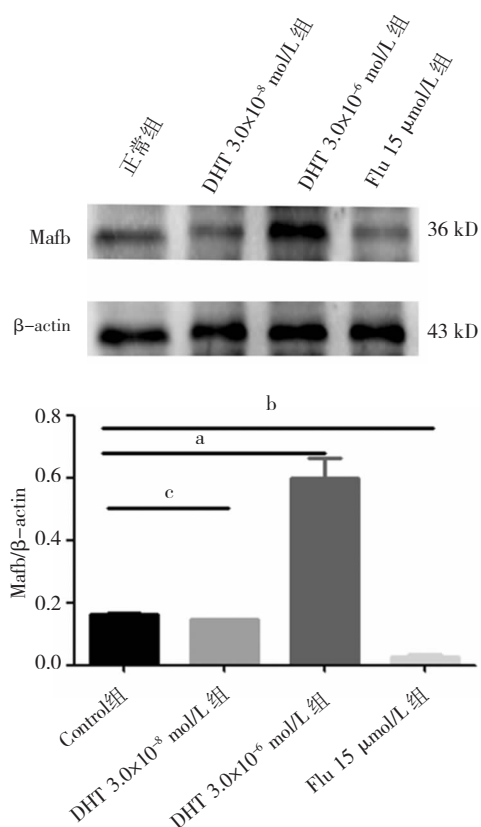


A. Mafb 在 DHT 组与 Flu 组中的表达情况

与正常组相比, a: $P=0.000$; b: $P=0.009$; c: $P=0.010$

B. Mafb 在各干预组中的表达强弱

图 4 Mafb 在各组中的表达



与正常组相比, a: $P=0.000$; b: $P=0.040$; c: $P=0.960$

图5 成纤维细胞中 Maflb 的表达定量

3 讨论

学者证实尿道由生殖结节生长的背侧尿道板与腹侧的尿道褶融合而形成^[13]。它的发生包括尿生殖窦的形成、尿道板的融合、间质细胞与上皮细胞的相互作用以及上皮的凋亡等过程^[14-15]。其中,间质细胞对上皮细胞的诱导及上皮细胞对间质细胞的反馈在男性尿道发生发育过程中起着十分重要的作用^[16]。Djakovic^[17]和 Mcclain^[18]等发现必须在相应的间充质细胞诱导下,内胚层来源的尿道板细胞方能分化发育成具有复层鳞状结构的尿道上皮间,它的功能异常很可能造成男性尿道的发育畸形,如尿道下裂。间充质发育而来的成纤维细胞是构成结缔组织的重要细胞,它存在于全身各个组织中,具有连接组织结构和修复功能,起着维持器官组织结构的作用。

成纤维细胞是间质结缔组织的主要细胞之一,是由胚胎时期间充质细胞直接分化而来,其生物学

功能在一定程度上反映了胚胎时期间质发育情况。同时,作为胚胎时期雄激素主要的靶细胞,其雄激素受体(androgen receptor, AR)表达丰富,而 AR 对于雄激素信号的传递起关键作用^[19]。雄激素促使胚胎外生殖器原基向雄性方向发育,而细胞中 AR 的表达水平可直接影响胚胎外生殖器的发育。正常条件下,雄激素进入细胞后与胞浆中热休克蛋白偶联的 AR 结合,使其构象发生改变,释放出结合了雄激素的 AR,该配体受体复合物通过核膜进入细胞核与 DNA 结合并活化引起相关的目的基因表达,进而发挥其生物学效应^[20-21]。作为雄性外生殖器性别分化障碍最常见疾病,尿道下裂畸形与 AR 功能异常密切相关^[22]。近年泌尿生殖器发育过程中雄激素作用机制研究是热点,并筛选出 Maflb 这一重要下游基因。

目前,尚缺乏雄激素与 Maflb 基因调控关系的深入研究。文献报告, Maflb 广泛表达于尿道板周围间质,在雄性胎鼠的生殖结节中表达显著上升,而在雌性胎鼠的生殖结节中表达明显降低,说明 Maflb 是一个性别差异化表达的基因,可能与雄激素有潜在的关联^[11]。本课题组首次发现在包皮成纤维细胞株中,雄激素会上调 Maflb 的表达,随着 DHT 浓度的升高, Maflb 的表达逐渐增强,与 AR 一样呈活化状态^[23],主要聚集于细胞核,作为核转录因子影响细胞的生物学行为;而作为 AR 拮抗剂的 Flu 会显著下调 Maflb 的表达,提示雄激素受体可能与 Maflb 存在密切联系。有学者认为 AR 是通过结合 Maflb 的 3' 非转录端(3'UTR)来实现对它的调控,并且与这个区域的雄激素反应元件(AREs)有关^[23]。在前列腺肿瘤研究中, AR 也可通过 3'UTR 的 AREs 调控下游基因的表达^[24]。在鼠中,分别敲除 AR 与 Maflb 基因,均可出现泌尿外生殖器的发育缺陷,表现为尿道下裂的表型,并且 AR 敲除小鼠的生殖结节中 Maflb 表达明显降低^[11],提示 AR 信号通路及下游 Maflb 参与泌尿外生殖器的发育过程。近年来研究发现, Wnt/β-Catenin 信号通路会影响 Maflb 的表达^[25],而这条信号通路亦与外生殖器的发育密切相关^[5]。同时在精原细胞分化研究中发现, Maflb 作为视黄酸(RA)信号通路的下游基因对其有着重要的作用^[26]。因此, Maflb 受多因素调控,且其异常表达,将最终导致泌尿生殖器发育畸形。同时有学者证实 Maflb 会促进细胞的增值分化^[7-10-27],但对于外生殖器中细胞的

影响未见报告,这将是本课题组下一步研究的重点。

综上所述,在体外培养的包皮成纤维细胞株中, *Mafb* 基因的表达受 DHT 与 Flu 的双重调控。*Mafb* 作为雄激素受体下游调控蛋白,可能是 AR 信号通路促进尿道发育的重要机制。

参 考 文 献

- [1] Wang MH, Baskin LS. Endocrine disruptors, genital development, and hypospadias[J]. *Journal of Andrology*, 2008, 29(5): 499–505.
- [2] Chevrier C, Petit C, Philippat C, et al. Maternal urinary phthalates and phenols and male genital anomalies[J]. *Epidemiology*, 2012, 23(2): 353–356.
- [3] Kalfa N, Philibert P, Baskin LS, et al. Hypospadias: interactions between environment and genetics[J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2011, 335(2): 89–95.
- [4] Yiee JH, Baskin LS. Environmental factors in genitourinary development[J]. *The Journal of Urology*, 2010, 184(1): 34–41.
- [5] Miyagawa S, Satoh Y, Haraguchi R, et al. Genetic interactions of the androgen and Wnt/ β -Catenin pathways for the masculinization of external genitalia[J]. *Molecular Endocrinology*, 2009, 23(6): 871–880.
- [6] Welsh M, Saunders PTK, Fiskin M, et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118(4): 1479–1490.
- [7] Moriguchi T, Hamada M, Morito N, et al. *MafB* is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2006, 26(15): 5715–5727.
- [8] Labott AT, Lopez-Pajares V. Epidermal differentiation gene regulatory networks controlled by MAF and MAFB[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(11): 1405–1409.
- [9] Lu J, Hamze Z, Bonnavion R, et al. Reexpression of oncoprotein *MafB* in proliferative β -cells and *Men1* insulinomas in mouse[J]. *Oncogene*, 2012, 31(31): 3647–3654.
- [10] Yu H, Jiang HL, Xu D, et al. Transcription factor *MafB* promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation through up-regulation of cyclin D1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(2): 700–708.
- [11] Suzuki K, Numata T, Suzuki H, et al. Sexually dimorphic expression of *Mafb* regulates masculinization of the embryonic urethral formation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(46): 16407–16412.
- [12] 黎晓莉, 张 雁, 吴 宏. 包皮成纤维细胞的生物学特性研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(1): 41–44.
- [13] Baskin LS, Erol A, Jegatheesan P, et al. Urethral seam formation and hypospadias[J]. *Cell and Tissue Research*, 2001, 305(3): 379–387.
- [14] Overland M, Li Y, Cao M, et al. Canalization of the vestibular plate in the absence of urethral fusion characterizes development of the human clitoris: the single zipper hypothesis[J]. *The Journal of Urology*, 2016, 195(4): 1275–1283.
- [15] Yi L, Adriane S, Mei C, et al. Canalization of the urethral plate precedes fusion of the urethral folds during male penile urethral development: the double zipper hypothesis[J]. *Journal of Urology*, 2015, 193(4): 1353–1360.
- [16] Abdullah NA, Pearce MS, Parker L, et al. Birth prevalence of cryptorchidism and hypospadias in northern England, 1993–2000[J]. *Archives of Disease in Childhood*, 2007, 92(7): 576–579.
- [17] Djakovic N, Nyarangi-Dix J, Ozturk A, et al. Hypospadias[J]. *Advances in Urology*, 2008, 2008(2): 650135.
- [18] McClain SA, Simon M, Jones E, et al. Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of granulation tissue induction[J]. *American Journal Of Pathology*, 1996, 149(4): 1257–1270.
- [19] Kim K, Liu W, Cunha GR, et al. Expression of the androgen receptor and 5 α -reductase type[J]. *Cell & Tissue Research*, 2002, 307(2): 145–153.
- [20] Gottlieb B, Lombroso R, Beitel LK, et al. Molecular pathology of the androgen receptor in male(in) fertility[J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10(1): 42–48.
- [21] Meehan KL, Sadar MD. Androgens and androgen receptor in prostate and ovarian malignancies[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2003, 8(1–3): 780–800.
- [22] Kalfa N, Sultan C, Baskin LS. Hypospadias: etiology and current research[J]. *Urologic Clinics of North America*, 2010, 37(2): 159–166.
- [23] Junshan L, Cheng X, Ruiqing C, et al. Effect of epidermal growth factor and testosterone on androgen receptor activation in urethral plate fibroblasts in hypospadias[J]. *Journal of Central South University(Medical Science)*, 2016, 41(5): 507–512.
- [24] Matsushita S, Suzuki K, Murashima A, et al. Regulation of masculinization: androgen signalling for external genitalia development[J]. *Nature Reviews Urology*, 2018, 15(S2): 358–368.
- [25] Thomas MA, Preece DM, Bentel JM. Androgen regulation of the prostatic tumour suppressor NKX3.1 is mediated by its 3' untranslated region[J]. *Biochemical Journal*, 2010, 425(3): 575–583.
- [26] Raverdeau M, Gely-Pernot A, Feret B, et al. Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(41): 16582–16587.
- [27] Miyai M, Tanaka YG, Kamitani A, et al. c-Maf and *MafB* transcription factors are differentially expressed in Huxley's and Henle's layers of the inner root sheath of the hair follicle and regulate cuticle formation[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2010, 57(3): 178–182.

(责任编辑:冉明会)