

论著·实验研究

L-精氨酸对宫内发育迟缓大鼠肾脏 *Pax2* 表达的影响

盖建芳 谢宗德 李雯 李素萍 胡劲涛

(中南大学湘雅二医院新生儿科,湖南 长沙 410011)

[摘要] 目的 研究 L-精氨酸(L-Arg)对宫内发育迟缓(IUGR)大鼠肾脏 *Pax2* 表达的影响。方法 孕鼠随机分为3组:正常对照组、IUGR组和干预组。正常对照组母鼠全程以普通饲料(含21%蛋白)喂养。IUGR组和干预组大鼠孕期均采用低蛋白饲料(含10%蛋白)喂养。仔鼠出生后,IUGR组母鼠常规饲料喂养;干预组母鼠在常规饲料喂养的基础上,于部分饮水中每日添加 L-Arg 200 mg/kg。取7 d、21 d、2月和3月龄仔鼠肾脏组织,用免疫组化和 Western blot 法检测 *Pax2* 表达。结果 免疫组化显示正常对照组仔鼠在各时间点均未见明显 *Pax2* 表达。IUGR组、干预组仔鼠2月龄和3月龄时,两组大鼠在肾小球和肾小管区可见 *Pax2* 阳性细胞,且3月龄鼠的 *Pax2* 表达比2月龄的更显著($P<0.05$);干预组的 *Pax2* 表达低于同龄 IUGR组($P<0.05$)。Western blot 检测发现,3组仔鼠肾脏在7 d和21 d均未见 *Pax2* 蛋白明显表达。到2月龄和3月龄时,干预组和 IUGR组仔鼠肾组织 *Pax2* 蛋白表达均较正常对照组显著增多,但干预组的表达低于 IUGR组($P<0.01$)。结论 IUGR大鼠成年后肾脏 *Pax2* 基因有再表达现象;用 L-Arg 干预后 *Pax2* 表达明显减少。 [中国当代儿科杂志,2011,13(2):145-148]

[关键词] 宫内发育迟缓; *Pax2*; 肾脏; L-精氨酸; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)02-0145-04

Effect of L-arginine on *Pax2* expression in the kidneys of pup rats with intrauterine growth retardation

GE Jian-Fang, XIE Zong-De, LI Wen, LI Su-Ping, HU Jin-Tao. Department of Neonatology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (Xie Z-D, Email: xiezdz9099@yahoo.com.cn)

Abstract: **Objective** To study the effect of L-arginine (L-Arg) on *Pax2* expression in the kidneys of pup rats with intrauterine growth retardation (IUGR). **Methods** Pregnant rats were randomly assigned into three groups: normal, IUGR and L-Arg treated IUGR. The rats in the normal group were fed with ordinary forage (21% protein) during pregnancy. Those in the other two groups were fed with low diet forage (10% protein) during pregnancy. The L-Arg treated group was given drinking water containing L-Arg (200 mg/kg) daily during 21 days of lactation. *Pax2* expression in renal tissues was measured with immunohistochemical staining and Western blot in pup rats of 7 days, 21 days, 2 months and 3 months old. **Results** The immunohistochemical staining showed that *Pax2* was not expressed in the pup rats from the normal group at any time point. *Pax2* positive cells were found in renal glomerulus and kidney tubules of 2-months- and 3-months-old rats from the IUGR and L-Arg treated groups. And *Pax2* expression in 3-months-old rats was significantly higher than that in 2-months-old rats ($P<0.05$). L-Arg treatment decreased significantly the *Pax2* expression in 2-months- and 3-months-old rats when compared with the untreated IUGR group ($P<0.05$). Western blot showed that *Pax2* protein was not expressed in 7-days- and 21-days-old pup rats from three groups. *Pax2* protein expression in 2-months- and 3-months-old pup rats from the IUGR and L-Arg treated groups increased significantly compared with normal controls. *Pax2* protein expression in the pup rats from the L-Arg treated group was significantly lower than that in the untreated IUGR pup rats ($P<0.01$). **Conclusions** *Pax2* is expressed in the kidneys of IUGR rats during adulthood. L-Arg treatment can decrease the expression of *Pax2*. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (2):145-148]

Key words: Intrauterine growth retardation; *Pax2*; Kidney; L-arginine; Rats

Pax2 基因是 *Pax* 家族成员中唯一可在肾脏表达又和肾形态密切相关的基因,主要参与早期肾脏足细胞、肾小管上皮细胞分化的调控,对以后的内皮

细胞、系膜细胞的发育亦有引导作用^[1]。正常情况下,*Pax2* 在晚期和成熟肾组织基因关闭^[2],但 Yang 等^[3]对足细胞病变明显的特发萎缩性肾病和 HIV

[收稿日期]2010-03-20;[修回日期]2010-07-25

[作者简介]盖建芳,男,博士,医师。现工作单位:山西省儿童医院,邮编:030013。

[通信作者]谢宗德,教授。

相关性肾病进行研究,发现存在 *Pax2* 足细胞的再表达。有研究发现宫内发育迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR)与成年后的心血管疾病、糖尿病、肾脏结构和功能等的异常有密切关系^[4]。IUGR 大鼠存在肾脏的病理改变,是否也出现肾脏 *Pax2* 的表达变化还未见报道。为此,本研究检测 *Pax2* 在 IUGR 大鼠肾组织的表达,并给予 L-精氨酸(L-Arg)干预,观察 L-Arg 对 IUGR 大鼠肾组织 *Pax2* 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 3 月龄 Sprague-Dawley (SD) 二级大鼠雌、雄性各 24 只,体重 250 ~ 300 g,由中南大学湘雅二医院实验动物中心负责购买,并提供饲养和观察场地(湖南省实验动物管理委员会,合格证:001 号;环境设施合格证:028 号)。雌、雄大鼠分笼适应性饲养 1 周,按雌雄 1:1 的比例于每日下午 6 时左右置于同一笼中交配。次日清晨在底板上检测出阴栓者定为受孕成功,作为妊娠第 1 天,孕鼠进入实验分组。

1.2 主要仪器与试剂

冰冻切片机(Thermo Shandon 公司,英国);烤箱(DGX-91438-2 型,上海福玛实验设备有限公司);医用超低温冰箱:MDF-382E 型,日本三洋公司。*Pax2* 抗体为美国 ZYMED 公司产兔抗大鼠多克隆抗体,免疫组化 SP-AP 试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司。PCR 仪(Eppendorf);Du800 紫外分光光度计(Beckman);水平电泳仪和凝胶图像成像系统(Bio-Rad);台式低温高速离心机(Beckman);垂直电泳槽和蛋白转印槽(Bio-Rad);蛋白裂解液(58.5% 氯化钠 500 μ L, 372 mg/mL EDTA 10 μ L, 1 M Tris-HCl 50 μ L, 抑肽酶 5 μ L, 1.74 mg/mL PMSF 50 μ L, 双蒸水加至 5 mL)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验饲料 本实验所用饲料购至湖南农业大学,并由湖南省疾病预防控制中心测定饲料蛋白含量和总热量。每 100 kg 普通饲料和低蛋白饲料的配方含玉米分别为 35 kg 和 53 kg、三等粉分别为 20 kg 和 43 kg、麦麸分别为 15 kg 和 2 kg、豆饼分别为 20 kg 和 1 kg、鱼粉分别为 10 kg 和 1 kg、蛋白含量分别为 21% 和 10%、热量分别为 3375 kcal/kg 和 3405 kcal/kg。

1.3.2 实验分组 孕鼠按受孕先后顺序随机平均分为 3 组:正常对照组、IUGR 组和干预组。参照文献^[5-6]报道的方法,建立 IUGR 模型。正常组母鼠全程以常规饲料(含 21% 蛋白)喂养。IUGR 组和干预组孕期均采用低蛋白饲料(含 10% 蛋白)喂养。仔鼠出生后,IUGR 组母鼠常规饲料喂养;干预组母鼠在常规饲料喂养的基础上,于部分饮水中添加 L-Arg (Sigma 公司),每日 200 mg/kg。母乳喂养仔鼠 21 d 后断乳、分笼。3 组仔鼠均用常规饲料喂养、自由饮水,直至实验结束。整个哺乳期间保证每窝 6 ~ 8 只仔鼠;每窝多于 8 只仔鼠的,多出的仔鼠于出生 1 d 内即随机剔除实验;产仔 > 12 只和 < 6 只的母鼠连同其仔鼠一起剔除实验。每组每个时间点取 5 只仔鼠分析。

1.3.3 肾脏组织冰冻切片制备 3 组仔鼠分别于 7 d、21 d、2 月和 3 月龄时的上午用 10% 水合氯醛 35 μ L/g 腹腔注射麻醉,剖腹取右肾,沿肾门横断面切成两半,迅速置冻存管中, - 70℃ 冰箱内保存。使用前 2 h 将切片机的温度预调至 - 20℃,取 - 70℃ 肾脏一半,置于切片机冷冻夹上,使肾脏短轴与切片刀平行,把反卷板前缘调至与切片刀平行,不能高出或低于切片刀,厚度调至 3 μ m,用毛笔将制作满意的切片展平,立即裱贴于载玻片上。裱片后切片在 56℃ 烤箱中烤片 45 s,使切片与载玻片牢固粘连不易脱片。切片制好后,储存于冰箱待测。

1.3.4 免疫组化方法检测 *Pax2* 表达 免疫组化按 SP-AP 试剂盒说明进行。*Pax2* 阳性表达细胞为胞核着色,细胞核或胞浆显色为棕黄色者为阳性表达细胞。*Pax2* 阳性表达判断标准及方法,参照文献^[7]如下:每张切片选取 5 个肾小球区和 5 个小管区进行计数,计数选区内 5 个不同视野内 100 个细胞中阳性表达细胞率并取其平均值。

1.3.5 Western blot 检测大鼠肾脏 *Pax2* 蛋白表达 Western blot 检测大鼠肾脏皮质 *Pax2* 蛋白表达,结果以样本吸光度值/对照 GAPDH 吸光度值的比值表示。

1.4 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 11.5 统计软件处理,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间均数比较用 One-Way ANOVA 分析,组间两两比较采用 LSD 法;率的比较采用卡方检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功建立 IUGR 大鼠模型

连续交配 7 d 后,正常组母鼠假孕 2 只,6 只怀孕母鼠共产仔鼠 58 只,平均每窝产仔 10.0 ± 4.7 只,仔鼠平均出生体重为 7.0 ± 0.5 g;产出 IUGR 仔鼠仅 3 只,1 只于围产期死亡。IUGR 组母鼠 8 只,全部受孕,共产仔鼠 90 只,平均每窝产仔 11.0 ± 2.6 只,仔鼠平均出生体重为 6.0 ± 0.6 g;产出的 IUGR 仔鼠 57 只,有 8 只于围产期死亡。各组孕鼠

分娩时间均在受孕后第 20 ~ 23 天内,且 14 只孕鼠均产仔,未发生流产现象。各组的仔鼠数目、体重、IUGR 发生率及围产期死亡率见表 1。

2.2 免疫组织化学法检测 Pax2 表达

正常组大鼠在各个时间点均未见明显 Pax2 表达。IUGR 组和干预组大鼠在 7 d 龄和 21 d 龄时肾脏均未见 Pax2 的明显表达;2 月龄和 3 月龄时,两组大鼠在肾小球和肾小管区可见 Pax2 阳性细胞的表达,且 3 月龄的 Pax2 的表达明显强于 2 月龄 ($P < 0.05$);干预组的 Pax2 表达低于同龄 IUGR 组 ($P < 0.01$ 或 0.05)。见图 1 及表 2。

表 1 两组孕鼠产仔情况

组别	孕鼠(只)	产仔(只)	每窝产仔(只) ($\bar{x} \pm s$)	仔鼠体重(g)	IUGR 鼠例(%)	围生期死亡例(%)
正常组	6	58	10.0 ± 4.7	7.0 ± 0.5	3(5)	1(2)
IUGR 组	8	90	11.0 ± 2.6	6.0 ± 0.6^a	57 (63) ^a	8(9)

a:与正常组比较, $P < 0.01$

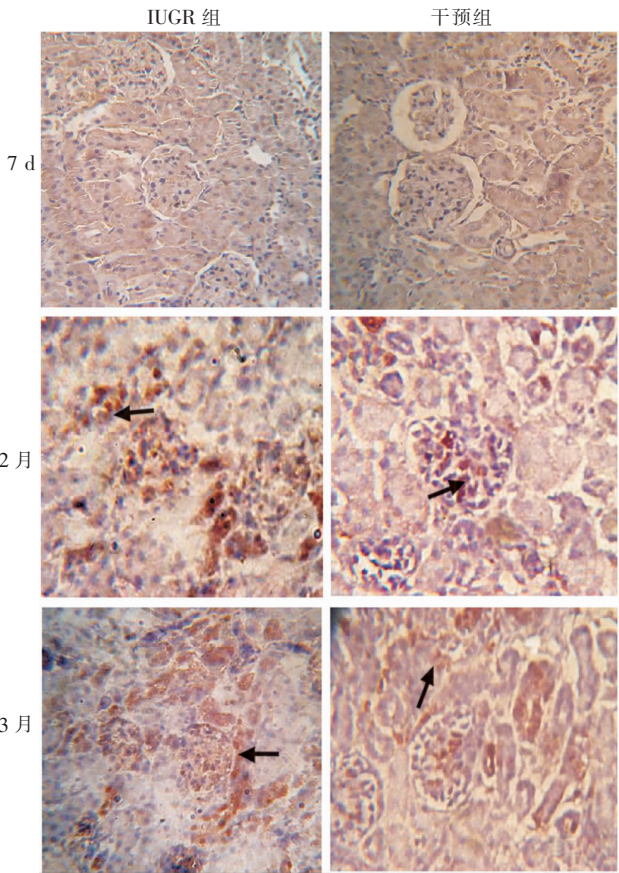


图 1 Pax2 表达(DAB, $\times 200$) 两组 7 d 龄时未见 Pax2 表达;2 月龄和 3 月龄时干预组的 Pax2 表达低于同龄 IUGR 组。棕黄色颗粒为阳性表达(箭头所示)。

表 2 免疫组化法检测 Pax2 表达 ($\bar{x} \pm s, \%, n = 5$)

组别	肾小球		肾小管	
	2 月	3 月	2 月	3 月
正常组	0	0	0	0
IUGR 组	0.18 ± 0.04^a	$0.33 \pm 0.08^{a,b}$	0.27 ± 0.01^a	$0.42 \pm 0.04^{a,b}$
干预组	$0.11 \pm 0.06^{a,b}$	$0.29 \pm 0.05^{a,d,e}$	$0.23 \pm 0.02^{a,c}$	$0.30 \pm 0.03^{a,d,e}$
F 值	7.58	6.75	5.67	10.56
P 值	0.01	0.02	0.02	0.01

a:与正常组比较, $P < 0.01$; b:与 IUGR 组 2 月龄比较, $P < 0.05$; c:与 IUGR 组 2 月龄比较, $P < 0.01$; d:与 IUGR 组 3 月龄比较, $P < 0.05$; e:与同组 2 月龄比较, $P < 0.05$

2.3 Western blot 检测肾脏组织 Pax2 蛋白表达

Western blot 检测发现,3 组大鼠肾脏在 7 d 和 21 d 均未见 Pax2 蛋白的明显表达。到 2 月龄和 3 月龄时,干预组、IUGR 组大鼠肾组织 Pax2 蛋白表达均较正常组显著增多,但干预组的表达明显低于 IUGR 组 ($P < 0.01$);而且 3 月龄大鼠肾组织 Pax2 蛋白表达均高于 2 月龄大鼠 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 Western blot 检测 Pax2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	2 月龄	3 月龄
正常组	0.05 ± 0.01	0.21 ± 0.02^c
IUGR 组	0.31 ± 0.03^a	$0.41 \pm 0.03^{a,c}$
干预组	$0.19 \pm 0.02^{a,b}$	$0.30 \pm 0.02^{a,b,c}$
F 值	214.56	80.09
P 值	< 0.01	< 0.01

a:与正常组比较, $P < 0.01$; b:与 IUGR 组比较, $P < 0.01$; c:与同组 2 月龄比较, $P < 0.01$

3 讨论

肾脏正常发育及其形态结构的完善与其功能的

关系密不可分。在这一发育过程中,新的肾单位不断在分支集合管末端产生,同时早期形成的肾单位逐渐成熟并开始其滤过功能。这种正常发育是靠许多调节分子来维持的,其中一些调节网络的调控基因得到确认^[8],如 *Pax* 基因,它是发育调控基因家族成员之一,其中 *Pax2* 基因是 9 个 *Pax* 家族成员中唯一可在肾脏表达,且又和肾形态发生密切相关的成员。它表达于发育期前肾、中肾和后肾的小管,且在肾小管形态及功能中发挥重要作用^[9]。*Pax2* 表达的时间和水平对肾脏的正常发育非常关键,如失调则可导致先天性的肾发育异常^[10]。朱翠平等^[11]研究发现 *Pax2* 在原始肾小管强表达,成熟近端小管不再有表达,远端小管仍持续微弱表达,说明 *Pax2* 不仅是肾小管早期分化发育的重要调控分子,对成熟肾小管正常组织结构维持亦起部分作用,成熟肾小管 *Pax2* 基因并未全部关闭;输尿管芽是早期集合管,*Pax2* 在此部位尤其是其末端部分表达明显,在多数成熟集合管仍明显显色,说明 *Pax2* 在胎儿 34 周前是持续表达的。是否以后仍有表达还需进一步研究证实,但可以说明在 34 周人类肾脏分化停止时,*Pax2* 基因在集合管仍是开放的。皮蕾等^[12]研究显示,在受损的肾脏中基因 *Pax2* 重新表达,作用于肾小管上皮细胞,使其向肌成纤维细胞转分化,从而导致大鼠慢性肾间质纤维化。

近年来的研究表明,肌体内广泛存在左旋精氨酸—一氧化氮(L-Arg-NO)通路,L-Arg-NO 通路的广泛性决定了其生理功能的广泛性和复杂性。研究表明,给予 L-Arg 可以增强血管内皮细胞一氧化氮合酶的活性,促进 NO 的合成与释放^[13]。有研究表明,许多肾脏病变均与 NO 合成不足有关^[14],NO 对肾小球的直接作用日益受到重视^[15]。Gil 等^[16]用 L-Arg 干预宫内营养限制的大鼠,发现其成年期 24 h 尿蛋白量明显减低。周盾等^[17]研究认为体内 NO 降低是蛋白尿发生发展的重要原因。本研究从新生鼠期给予 L-Arg 干预更接近临床,期望干预后能起到改善肾脏结构和功能的作用。

正常情况下,基因 *Pax2* 在肾脏发生完成后表达很少或不再表达。只有肾脏出现病理损害后,才会重新表达。本研究发现,3 组大鼠肾脏 *Pax2* 基因在 7 d 和 21 d 均未见明显表达;到 2 月龄时,IUGR 大鼠的肾小球和肾小管区均可见 *Pax2* 阳性细胞的表达,而正常组则无显著表达;3 月龄时,IUGR 大鼠的肾小球和肾小管区 *Pax2* 表达比 2 月龄时增强。Western blot 检测也发现,在 7 d 和 21 d 时 3 组大鼠的肾脏均未见 *Pax2* 蛋白明显表达;到 2 月龄和 3 月

龄时,IUGR 大鼠肾组织 *Pax2* 蛋白表达量较正常组显著增加,并且在 3 月龄的表达较 2 月龄的显著。提示 IUGR 组大鼠可能从生后 2 个月开始出现肾小球和肾小管结构的损害,而在 7 d 和 21 d 时,*Pax2* 基因可能由于表达量很少,或大鼠肾脏尚未出现明显结构和功能的异常,故未见明显表达。用 L-Arg 干预后,2 月龄和 3 月龄大鼠的 *Pax2* 表达比 IUGR 组明显降低。本研究结果显示,L-Arg 干预可能在一定程度上起到减轻肾脏损害的作用;*Pax2* 表达随着 IUGR 大鼠年龄的增加逐渐增加,和既往研究^[6]的 IUGR 大鼠肾功能损害的变化趋势是一致的。

[参 考 文 献]

- [1] Quaggin SE. Transcriptional regulation of podocyte specification and differentiation[J]. Microsc Res Tech, 2002, 57(4): 208-211.
- [2] Dressler GR. Pax-2, kidney development, and oncogenesis[J]. Med Pediatr Oncol, 1996, 27(5): 440-444.
- [3] Yang Y, Gubler MC, Beaufils H. Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy[J]. Nephron, 2002, 91(3): 416-423.
- [4] 陈径,徐虹,沈茜,郭维,孙利,林善谈. 宫内发育迟缓对大鼠血压及肾功能影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2006, 11(22): 706-707.
- [5] 袁可,谢宗德,胡劲涛,李雯. 牛磺酸对低出生体质量仔鼠胰岛 β 细胞超微结构的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(14): 898-899.
- [6] 盖建芳,谢宗德,陈平洋,李雯,胡劲涛,李素萍. L-精氨酸对宫内发育迟缓大鼠肾功能的影响及机制探讨[J]. 营养学报, 2009, 31(1): 38-41.
- [7] 易著文,何小解,卢向阳,党西强,吴小川,何庆南,等. 儿茶素对肾病综合症大鼠细胞周期调控蛋白表达的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2003, 19(1): 58-59.
- [8] Bard JB. Growth and death in the developing mammalian kidney: signals, receptors and conversations[J]. Bioessays, 2002, 24(1): 72-82.
- [9] James RG, Kamei CN, Wang Q, Jiang R, Schultheiss TM. Odd skipped related 1 is required for development of the metanephric kidney and regulates formation and differentiation of kidney precursor cells[J]. Development, 2006, 133(15): 2995-3004.
- [10] Stayner CK, Cunliffe HE, Ward TA, Eccles MR. Cloning and characterization of the human PAX2 promoter[J]. J Biol Chem, 1998, 273(39): 25472-25479.
- [11] 朱翠平,易著文,何小解. 人胚胎肾组织形态发生与 *Pax2* 表达[J]. 医学临床研究, 2005, 22(9): 1207-1211.
- [12] 皮蕾,姜饶,欧阳涓,周青松,崔颖鹏,黄彬. *Pax2* 基因在肾小管上皮细胞转分化中的作用[J]. 华中医杂志, 2007, 31(1): 7-10.
- [13] 张煜,焦青萍,黄芸,张维,徐红,李瑾. 左旋精氨酸对离体培养 SHR 大鼠主动脉内皮细胞一氧化氮合成酶活性的影响[J]. 老年医学与保健, 2002, 8(4): 210.
- [14] 孙慧,陈意生,谯怡烈. 内皮素致肾脏病理变化的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(4): 312-315.
- [15] 阳晓. 一氧化氮与慢性肾功能衰竭[J]. 国外医学泌尿系统分册, 1996, 16(5): 219-221.
- [16] Gil FZ, Lucas SR, Gomes GN, Cavanal Mde F, Goimbra TM. Effects of intrauterine food restriction and long-term dietary supplementation with L-arginine on age-related changes in renal function and structure of rats[J]. Pediatr Res, 2005, 57(5 Pt 1): 724-731.
- [17] 周盾,孙洞箫,冯欣. 左旋精氨酸在预防阿霉素大鼠蛋白尿产生中的作用机制[J]. 中国医师杂志, 2003, 5(6): 765-766.

(本文编辑:俞 燕)