

· 实验研究 ·

L-精氨酸对宫内发育迟缓胎鼠胰岛素样生长因子及其结合蛋白表达的影响

卢岩, 刘晓梅, 李书琴

(中国医科大学附属第二医院(盛京医院)中心实验室, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 宫内发育迟缓(IUGR)儿常有脑发育的异常, L-精氨酸具有舒张血管、增加胎盘血流的作用, 可用于改善胎盘缺氧状态, 促进胎儿生长发育。用被动吸烟法制作孕鼠 IUGR 模型, 孕 8 ~ 20 d 给予不同剂量 L-精氨酸, 了解其对宫内发育迟缓胎鼠脑内胰岛素样生长因子及其结合蛋白表达的影响, 并探讨 L-精氨酸的作用机制。**方法** 孕鼠随机分为 4 组: 对照组、模型组、L-精氨酸小剂量和大剂量防治组, 每组 9 只。孕 21 d 剖宫取胎, 应用酶联免疫吸附法检测各组胎鼠脑组织胰岛素样生长因子 I (IGF-I)、胰岛素样生长因子 II (IGF-II)、胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP3)含量, 应用荧光定量 RT-PCR 法检测各组胎鼠脑组织 IGF-I mRNA 表达。**结果** 与对照组相比较, 模型组胎鼠脑组织中 IGF-I (0.789 ± 0.062 ng/mg vs 0.947 ± 0.042 ng/mg)、IGF-II (0.270 ± 0.020 ng/mg vs 0.374 ± 0.015 ng/mg) 含量均比对照组明显降低, IGFBP3 (0.253 ± 0.011 ng/mg vs 0.089 ± 0.015 ng/mg) 含量比对照组明显升高, IGF-I mRNA 表达量 ($13.12 \pm 1.39 \times 10^4$ cps/ μ g RNA vs $21.28 \pm 3.54 \times 10^4$ cps/ μ g RNA) 比对照组明显降低, 差异均有显著性 ($P < 0.01$)。与模型组相比较, 小剂量和大剂量 L-精氨酸防治组 IGF-I 含量明显增高, 分别为 0.937 ± 0.067 ng/mg 和 0.858 ± 0.077 ng/mg, IGF-II 含量明显增高, 分别为 0.318 ± 0.018 ng/mg 和 0.354 ± 0.021 ng/mg, IGFBP3 含量明显降低, 分别为 0.132 ± 0.006 ng/mg 和 0.146 ± 0.009 ng/mg 差异有显著性 ($P < 0.01$ 或 < 0.05)。同时小剂量和大剂量 L-精氨酸防治组 IGF-I mRNA 表达量也明显增高, 分别为 ($19.24 \pm 2.48 \times 10^4$ cps/ μ g RNA 和 $17.35 \pm 2.30 \times 10^4$ cps/ μ g RNA vs $13.12 \pm 1.39 \times 10^4$ cps/ μ g RNA), 差异均有显著性 ($P < 0.01$)。**结论** L-精氨酸可增加被动吸烟致宫内发育迟缓胎鼠脑内 IGF-I、IGF-II 含量和 IGF-I mRNA 的表达, 降低 IGFBP3 含量。L-精氨酸防治 IUGR 的机制与其对胰岛素样生长因子及其结合蛋白表达的影响有关。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(4): 319-322]

[关键词] L-精氨酸; 宫内发育迟缓; 胰岛素样生长因子; 胰岛素样生长因子结合蛋白; 大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)04-0319-04

Effects of L-arginine on the expression of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding protein 3 in rats with intrauterine growth retardation

LU Yan, LIU Xiao-Mei, LI Shu-Qin. Central Laboratory, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Li S-Q, Email: lisq1@cmu2h.com)

Abstract: Objective Intrauterine growth retardation (IUGR) may contribute to the disorder of development of fetal brains. L-arginine has been known to be effective in blood vessel distension and improving the blood circulation of placentas. Recent studies have shown that L-arginine can ameliorate the placental hypoxia and improve the development of fetus. This study aimed to explore the effects of L-arginine on the expression of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, IGF binding protein-3 (IGFBP3) and IGF-I mRNA in brains of IUGR rats and the possible mechanisms of L-arginine. **Methods** Thirty-six pregnant rats were randomly assigned into four groups: Control, Model, Low dose L-arginine (100 mg/kg) and High-dose L-arginine (200 mg/kg L-arginine) groups ($n=9$ each). IUGR was induced by passive smoking in rats from the last three groups. L-arginine was administered for the last two groups between days 8 and 20 of gestation. On day 21 of gestation, the pup rats were delivered by cesarean section. The levels of IGF-I, IGF-II and IGFBP3 in the brains of pup rats were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the expression of IGF-I mRNA was detected by fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR). **Results** The levels of IGF-I, IGF-II and IGF-I mRNA expression in the Model group were significantly lower than in the Control group, with the IGF-I levels of 0.789 ± 0.062

[收稿日期] 2005-12-09; [修回日期] 2006-03-22

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(9910500709)

[作者简介] 卢岩, 女, 博士, 助理研究员。主攻方向: 胎儿宫内发育迟缓。

[通讯作者] 李书琴, 教授, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)中心实验室。邮编 110004。

ng/mg vs 0.947 ± 0.042 ng/mg, the IGF-II levels of 0.270 ± 0.020 ng/mg vs 0.374 ± 0.015 ng/mg and the IGF-I mRNA expression of $(13.12 \pm 1.39) \times 10^4$ cps/ μ g RNA vs $(21.28 \pm 3.54) \times 10^4$ cps/ μ g RNA ($P < 0.01$). In contrast, the IGFBP3 levels in the Model group were significantly higher than in the Control group (0.253 ± 0.011 ng/mg vs 0.089 ± 0.015 ng/mg; $P < 0.01$). Low or high dose L-arginine treatment increased significantly the IGF-I levels from 0.789 ± 0.062 ng/mg (Model group) to 0.937 ± 0.067 ng/mg (low dose group) or 0.858 ± 0.077 ng/mg (high dose group), the IGF-II levels from 0.270 ± 0.020 ng/mg (Model group) to 0.318 ± 0.018 ng/mg (low dose group) or 0.354 ± 0.021 ng/mg (high dose group) and the IGF-I mRNA expression from $(13.12 \pm 1.39) \times 10^4$ cps/ μ g RNA (Model group) to $(19.24 \pm 2.48) \times 10^4$ cps/ μ g RNA (low dose group) or $(17.35 \pm 2.30) \times 10^4$ cps/ μ g RNA (high dose group) ($P < 0.01$). The IGFBP3 levels were significantly reduced after low or high dose L-arginine treatment (0.132 ± 0.006 ng/mg or 0.146 ± 0.009 ng/mg) compared with those of the Model group (0.253 ± 0.011 ng/mg) ($P < 0.01$).

Conclusions L-arginine can increase the levels of IGF-I and IGF-II and the IGF-I mRNA expression, and decrease the IGFBP3 level in the brain of rats with IUGR induced by passive smoking, thereby offering protective effects against IUGR.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8 (4):319-322]

Key words: L-arginine; Intrauterine growth retardation; Insulin-like growth factor; Insulin-like growth factor binding protein; Rats

胎儿宫内发育迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR)是围产期主要并发症之一,不仅影响胎儿期的发育,也影响儿童期和青年期的智力体格发育,并与成年后的心血管疾病、糖尿病等的发生有关^[1]。目前,IUGR的发病机制及防治研究已成为围产医学领域内重要的研究课题之一,尤其关于内分泌因素与IUGR的研究引起了越来越多学者的关注。生长因子是一类与生长发育密切相关的多肽类内分泌因子,其中胰岛素样生长因子(insulin like growth factor, IGF)具有胰岛素样的促合成代谢作用,可促进细胞增殖和分化,抑制蛋白质降解,对胎儿生长发育具有重要调节作用,因此与IUGR的发生发展密切相关。IGF还是重要的神经营养因子,在脑组织生长发育和损伤保护中具有重要作用^[2]。胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding protein, IGFBP)是一组与IGF有高度亲和力的蛋白质,其中IGFBP3是血浆及组织中主要的IGFBP。因此,本研究在被动吸烟造成胎鼠IUGR模型的基础上,孕中晚期给予不同剂量L-精氨酸干预,检测胎鼠脑内IGF-I, IGF-II, IGFBP3含量及IGF-I mRNA表达,探讨L-精氨酸的作用与IGF及其结合蛋白表达变化的关系,为其临床应用于IUGR的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

Wistar 雌性大鼠 36 只,体重 220 ~ 260 g(购自中国医科大学实验动物中心)。按 2:1 雌雄比合笼。次日晨取阴道涂片镜检,以发现精子作为妊娠第 1 天。孕鼠按受孕顺序随机分为 4 组:对照组,模型组,小剂量 L-精氨酸防治组和大剂量 L-精氨酸防

治组,每组 9 只。后 3 组予以烟熏诱导胎鼠 IUGR^[3],具体如下:孕 8 d 起至孕 20 d(相当于孕中晚期),孕鼠放入自制烟箱中吸烟(每次 8 ~ 10 只)。烟箱体积为 0.5 m × 0.5 m × 1.0 m,密闭,有进出风口,两风口之间用密闭塑料管相连。启动风机后在烟箱中点燃香烟,用抽吸法抽吸香烟,吸得的主烟气注入烟箱内,和在烟箱内自燃的侧烟气一起与空气混匀,20 min 内连续抽吸 3 支,然后关闭送风机,切断烟箱的进出风口,造成密闭环境。孕鼠在此环境中被动吸烟 2 h。所用香烟为湖南常德卷烟厂生产的银象牌香烟(烤烟型,每支含焦油 17 mg,烟气烟碱量 1.2 mg)。对照组孕 8 d 起至孕 20 d 每天在无烟的烟箱中 2 h,腹腔注射生理盐水 2 mL。模型组及两个防治组孕 8 d 起分别腹腔注射生理盐水 2 mL, L-精氨酸 100 mg/kg 和 200 mg/kg,每日 1 次。

1.2 实验药品、试剂与仪器

药用级 L-精氨酸(德国 Merck 公司);IGF-I、IGF-II、IGFBP3 定量 ELISA 试剂盒(上海森雄科技实业有限公司);TRIZOL 总 RNA 提取试剂(美国 Promega 公司)。MMV 逆转录酶及 TaqDNA 聚合酶(中山大学达安基因股份有限公司)。

大鼠 IGF-I 引物及荧光探针参照 Gene Bank,由中山大学达安基因股份有限公司设计合成。序列如下:上游引物:5'-TTCGTGTGTGGACCAAGGG-3';下游引物:5'-AATGCTGGAGCCATAGCCTG-3';TaqMan 荧光探针序列:5'-TTTACTTCAACAAGCCC-3'(探针的 5'端标以荧光报告基团 FAM,3'端标以荧光淬灭基团 MGB);扩增产物长度为 60 bp。

全自动荧光定量 PCR 仪为 ABI PRISM5700 型(美国 Applied Biosystems 公司),梯度基因扩增仪为 TP-600 型(日本 TaKaRa 公司)。

1.3 观测指标

1.3.1 取材 孕21 d剖宫取胎,胎鼠脑组织在液氮中10 min后, -70℃保存。

1.3.2 IGF- I ,IGF- II ,IGFBP3 含量的测定 每组各取7只胎鼠,按照试剂盒要求制备10%的胎鼠脑组织匀浆,酶联免疫吸附法测定胎鼠脑组织中IGF- I ,IGF- II ,IGFBP3 的含量。

1.3.3 总RNA的提取 按照试剂盒说明书操作。

1.3.4 逆转录合成cDNA(互补DNA)第一链 在10 μL的反应体系中,分别加入:样本RNA各1 μg;上游引物(20 pmol/μL)0.2 μL;下游引物(20 pmol/μL)0.2 μL;dNTPs(各25 mM)0.1 μL;逆转录酶MMLV 2.5 U;37℃ 60 min, 95℃ 3 min,产物即为cDNA。

1.3.5 阳性模板的标准梯度制备 IGF- I 阳性标准模板由中山大学达安基因股份有限公司制备,标准品的初始浓度为1 010 cps/mL。每次扩增前新鲜稀释阳性模板,取10⁷,10⁶,10⁵,10⁴,10³ cps/mL 5个梯度上机。

1.3.6 FQ-PCR测定 荧光定量PCR技术是在PCR基础上,添加了一条标记有2个荧光基团的探针。无PCR发生时,探针的荧光淬灭基团抑制了荧光报告基团的信号;当特异性PCR发生时,探针被Taq酶的5'-3'外切酶活性切断,荧光淬灭基团的抑制作用消失,从而引起荧光信号的增长,且初始DNA浓度对数和荧光信号的阈循环值(CT)呈反比线性关系。在50 μL反应体系中,分别加入不同浓度阳性定量标准品及待测样本的cDNA 5 μL,上、下游引物(20 pmol/μL)各0.5 μL;dNTP s(各25 mM)0.5 μL;荧光探针0.5 μL;Taq酶2 U。全自动荧光定量PCR仪中93℃ 2 min,然后93℃ 1 min,55℃ 1 min,共40个循环。反应结束后,任选4个阳性模

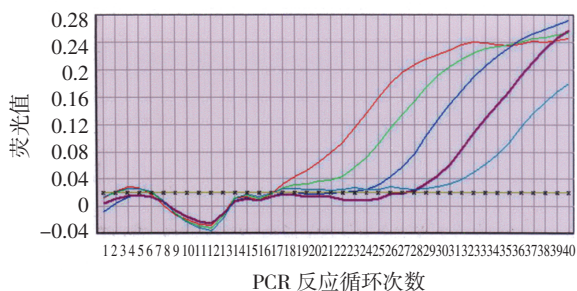


图1 IGF- I mRNA 荧光定量 RT-PCR 检测定量标准曲线 阳性模板标准品的初始浓度为10⁷,10⁶,10⁵,10⁴,10³ cps/mL,对应的CT值分别为15,18,23,27,31,浓度对数和CT值呈反比线性关系。

板标准梯度点分析,若相关系数 γ^2 大于0.96,表明线性关系良好。以PCR反应循环次数为横坐标,荧光值为纵坐标制成IGF- I 荧光定量RT-PCR检测的定量标准曲线,根据标准曲线,荧光定量PCR仪自动分析并计算结果,得出每微克总RNA中IGF- I mRNA的拷贝数。IGF- I 荧光定量RT-PCR检测的定量标准曲线见图1。

1.4 统计学分析

数据结果采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,率的比较采用 χ^2 检验,计量资料比较采用单因素方差分析,各组均数的两两比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 各组胎鼠脑组织中IGF- I ,IGF- II ,IGFBP3 的含量

与对照组相比较,模型组胎鼠脑组织中IGF- I ,IGF- II 含量明显下降($P < 0.01$),IGFBP3 含量明显升高($P < 0.01$)。小剂量L-精氨酸防治组和大剂量L-精氨酸防治组与模型组相比较,胎鼠脑组织中IGF- I ,IGF- II 的含量明显增加($P < 0.01$),IGFBP3 含量明显降低($P < 0.01$)。

表1 各组胎鼠脑组织中IGF- I ,IGF- II ,IGFBP3 含量
($n = 6, \bar{x} \pm s, \text{mg/g}$)

组别	IGF- I	IGF- II	IGFBP3
对照组	0.947 ± 0.042	0.374 ± 0.015	0.089 ± 0.015
模型组	0.789 ± 0.062 ^a	0.270 ± 0.020 ^a	0.253 ± 0.011 ^a
小剂量防治组	0.937 ± 0.067 ^c	0.318 ± 0.018 ^c	0.132 ± 0.006 ^{a,c}
大剂量防治组	0.858 ± 0.077 ^{a,b}	0.354 ± 0.021 ^c	0.146 ± 0.009 ^{a,c}

a 与对照组比较, $P < 0.01$; b 与模型组比较, $P < 0.05$, c $P < 0.01$

2.2 各组胎鼠脑组织中IGF- I mRNA 表达

荧光定量RT-PCR结果可见,模型组胎鼠脑组织IGF- I mRNA表达量比对照组明显下降($P < 0.01$),小剂量L-精氨酸治疗组和大剂量L-精氨酸治疗组与模型组比较,胎鼠脑组织中IGF- I mRNA表达量明显增加($P < 0.01$)。

表2 各组胎鼠脑组织中IGF- I mRNA 表达

($n = 8, \bar{x} \pm s, \times 10^4 \text{ cps}/\mu\text{gRNA}$)

组别	IGF- I mRNA
对照组	21.28 ± 3.54
模型组	13.12 ± 1.39 ^a
小剂量防治组	19.24 ± 2.48 ^b
大剂量防治组	17.35 ± 2.30 ^{a,b}

a 与对照组比较, $P < 0.01$; b 与模型组比较, $P < 0.01$

3 讨论

L-精氨酸具有舒张血管、增加胎盘血流,从而改善胎盘缺氧状态的作用^[4]。L-精氨酸作为一种氨基酸还可直接参与各种组织蛋白质的合成,是机体生长发育所必需的。动物实验已证实,食物中给予 L-精氨酸可改善低压性缺氧所导致的胎鼠宫内生长受限及体重下降,防止宫内发育迟缓鼠生后老龄期高血压及蛋白尿的发生^[5,6]。近年来将 L-精氨酸试用于临床也取得了一定的疗效,已证实 L-精氨酸口服及静脉注射均可改善 IUGR 妇女胎盘循环阻力的增高,促进胎儿生长发育,从而防治胎儿宫内发育迟缓^[7,8]。但 L-精氨酸的具体作用及其机制还需要进一步研究。

IGF 家族由两种多肽类生长因子 (IGF- I 和 IGF- II) 及其受体和 6 种结合蛋白所构成。研究已证实,宫内营养不良,缺氧或胎盘功能异常所致的胎儿 IUGR,均首先通过降低 IGF 的水平,从而使各型细胞分裂、分化、增殖、成熟或存活的能力以及组织器官对葡萄糖摄取和氧化及对氨基酸摄取能力的降低,细胞分裂周期延长、数量减少、功能障碍,最终导致其生长发育迟缓^[9]。血浆及组织中大部分 IGF 处于与 IGFBP 结合状态,结合后的 IGF 不表现出活性,只有 1% 呈游离形式的 IGF 是具有生物活性的部分。各种病理因素诱导下胎盘的 IGFBP3 生成异常增高,同时妊娠相关内源性 IGFBP 水解酶的活性降低导致 IGFBP3 水解减少也可导致 IGFBP3 的增加,但 IGFBP3 合成的具体调节机制目前尚不清楚,分析可能与胎盘缺血缺氧状态有关。

研究已证实小剂量和大剂量 L-精氨酸均可有效防治被动吸烟致胎鼠 IUGR 的发生,胎鼠体重及脑重均比模型组显著增加^[10]。进一步研究发现 IUGR 模型组胎鼠脑组织中 IGF- I 和 IGF- II 含量均比对照组明显下降,IGFBP3 含量比对照组明显升高;孕中晚期应用适量 L-精氨酸可使 IUGR 胎鼠脑组织中 IGF- I 和 IGF- II 含量增加,IGFBP3 含量下降。说明 L-精氨酸可通过影响 IGF 的含量对 IUGR 起防治作用。本研究还通过荧光定量 PCR 发现 IUGR 模型组胎鼠 IGF- I mRNA 表达下降,说明 IUGR 发生发展过程中确实存在 IGF- I 的不足,同时 IGFBP 含量增加,IGF- I 与 IGFBP 结合增加,具活性的部分减少,共同导致胎儿宫内生长发育迟缓。

L-精氨酸可以增加 IUGR 大鼠及胎鼠内源性一氧化氮 (nitrogen monoxide, NO) 的合成和释放,使组织保持血管内皮依赖性舒张活性,降低 IUGR 胎盘循环的阻力,降低血液黏度,改善胎儿胎盘循环的血运障碍。一方面改善了胎儿氧及养分的供应,提高胎儿营养状态,促进胎儿生长发育;另一方面, L-精氨酸治疗 IUGR 胎儿宫内营养不良的状况也可通过影响 IGF mRNA 转录后的加工而提高 IGF 水平,通过 IGF 家族的协同作用,对胎儿生长发育起明显的促进作用。L-精氨酸对 IUGR 的防治作用是多方面协同作用的结果,其中重要的途径之一就是影响内分泌因子如 IGF 及其结合蛋白的表达。

[参 考 文 献]

- [1] Gluckman PD, Harding JE. The physiology and pathophysiology of intrauterine growth retardation [J]. *Horm Res*, 1997, 48 (Suppl 1): 11-16.
- [2] O' Kuskus JR, Ye P, D' Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(22): 8435-8442.
- [3] 段涛,毕奴玛,杨幼明,黄敏丽. 采用被动吸烟法建立胎仔宫内发育迟缓大鼠模型 [J]. *上海实验动物学*, 1999, 19(1): 14-17.
- [4] Parra MC, Lees C, Mann GE, Pearson JD, Nicolaides KH. Vasoactive mediator release by fetal endothelial cells in intrauterine growth restriction and preeclampsia [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 184(3): 497-502.
- [5] Vosatka RJ, Hassoun PM, Harvey-Wilkes KB. Dietary L-arginine prevents fetal growth restriction in rats [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1998, 178(2): 242-246.
- [6] Gil FZ, Lucas SR, Gomes GN, Cavanal Mde F, Coimbra 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.
- [7] Sieroszewski P, Suzin J, Karowicz-Bilinska A. Ultrasound evaluation of intrauterine growth restriction therapy by a nitric oxide donor (L-arginine) [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2004, 15 (6): 363-366.
- [8] 李莉平,肖昕,王自能,肖小敏. L-精氨酸对胎儿宫内发育迟缓患者母血及脐血一氧化氮水平的影响 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2004, 6(1): 4-6.
- [9] Tapanainen PJ, Bang P, Muller HL, Wilson K, Rosenfeld RG. Hypoxia-induced changes in insulin-like growth factors and their binding proteins in pregnant rats [J]. *Horm Res*, 1997, 48(1): 227-234.
- [10] 卢岩,李书琴,吴旭. 左旋精氨酸对被动吸烟孕鼠作用的实验研究 [J]. *广东医学*, 2005, 26(2): 164-166.

(本文编辑:吉耕中)