基础研究 文章编号:0253-3626(2011)04-0404-04

成纤维细胞生长因子受体 1 在小鼠肾发育中的表达

田 娟[1],王 堃[2],郭 敏[1]
（辽宁医学院 1. 组织学与胚胎学教研室;2. 附属第一医院党政办公室,锦州 121001）

【摘 要】目的:观察成纤维细胞生长因子受体 1(Fibroblast growth factor receptors 1,FGFR1)在小鼠肾发育中的时空性表达,探讨 FGFR1 与肾发育的关系。方法:应用免疫组织化学技术结合体视学方法和免疫印迹法,测定不同胚龄(E)11.5、13.5、15.5 d 和 17.5 d 及生后日龄(P)1、7、14、21 d 和 40 d 小鼠肾组织内 FGFR1 的表达及其含量变化。结果:免疫组织化学结果显示 FGFR1 在各期肾小体、远端小管及集合管内均有表达,但在各期远端小管和集合管表达较强,而在各期肾小体表达较弱。体视学测量和免疫印迹结果均显示随着胚日龄的增加,FGFR1 在各期肾小体、远端小管及集合管的表达量逐渐增加。结论:FGFR1 可能对肾各结构的发育以及成熟肾的形态维持起重要作用。

【关键词】成纤维细胞生长因子受体 1;肾;发育;小鼠
【中国图书分类法分类号】R329.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-10-29

Expression of fibroblast growth factor receptor 1 in the developing kidney of mouse

TIAN Juan, et al
(*Department of Histology and Embryology, Liaoning Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To observe the temporospatial expression of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) in the developing kidney of mouse, and investigate the relation between fibroblast growth factor receptor 1 and kidney development. *Methods*: The expression of FGFR1 was examined by immunohistochemistry, stereological method and Western blot in embryo and postnatal mouse kidneys, including embryos (E11.5, 13.5, 15.5, 17.5 d) and postnatal mice (P1, 7, 14, 21, 40 d). *Results*: Immunohistochemical analysis showed that FGFR1 was expressed in all stages of glomeruli, distal tubules and collecting ducts. The results of stereology and Western blot showed that during kidney development, the expression of FGFR1 was increased in all stages of glomeruli, distal tubules and collecting ducts. *Conclusion*: FGFR1 might play an important role in kidney development and maturation.

【Key words】fibroblast growth factor receptor 1; kidney; development; mouse

作者介绍:田 娟(1976-),女,讲师,博士,研究方向:肾脏发育生物学。
通信作者:郭 敏,女,教授,Email: mguo1118@yahoo.com.cn。
基金项目:辽宁省教育厅科学技术研究资助项目(编号:L2010274);辽宁医学院青年科技启动基金资助项目(编号:Y2010Z005)。

[3] 符慧群,唐雪元,潘宇亮.川芎嗪和顺铂联合用对小鼠 Lewis 肺癌生长和转移的抑制作用[J].南华大学学报·医学版,2008,36(1):46-49.
[4] 沈 锷,郎景和.卵巢上皮性癌诊断和治疗中应注意的问题[J].中华妇产科杂志,2003,38(2):65-69.
[5] Xie K.Interleukin-8 and human cancer biology[J].Cytokine Growth Factor Rev,2001,12(4):375-391.
[6] Merritt W M,Lin Y G,Spannuth W A,et al.Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth[J].J Natl Cancer Inst,2008,100(5):359-372.
[7] Fu Y S,Lin Y Y,Chou S C,et al.Tetramethylpyrazine inhibits activities of glioma cells and glutamate neuro-excitotoxicity:Potential therapeutic application for treatment of gliomas[J].Neuro Oncol,2008,10(2):139-152.
[8] Li X Y,He J L,Liu H T,et al.Tetramethylpyrazine suppresses interleukin-8 expression in LPS-stimulated human umbilical vein endothelial cell by blocking ERK,p38 and nulear factor-kappaB signaling pathways [J].J Ethnopharmacol,2009,125(1):83-89.
[9] Sullivan N J,Sasser A K,Axel A E,et al.Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells [J].Oncogene,2009,28(33):2940-2947.
[10] Kuwabara Y,Yamada T,Yamazaki K,et al.Establishment of an ovarian metastasis model and possible involvement of E-cadherin down-regulation in the metastasis[J].Cancer Sci,2008,99(10):1933-1939.
[11] 李道成,梁立治,邓高丕.MMP-9 在上皮性卵巢癌组织中的表达及临床意义[J].实用癌症杂志,2008,23(1):1-2.
[12] Inoue K,Slaton J W,Eve B Y,et al.Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer[J].Clin Cancer Res,2000,6(5):2104-2119.

(责任编辑:冉明会)

成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor,FGF)是一组广泛分布于全身的多肽生长因子,其生物学效应是通过与成纤维细胞生长因子受体(Fibroblast growth factor receptors,FGFR)结合而实现[1]。FGFR 为免疫球蛋白基因超家族成员,目前已发现 5 种 FGFR,即 FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4 和 FGFR5,它们的氨基酸组成和序列相对保守,功能相近,参与介导细胞的生长、分化、迁移、存活等[2]。其中 FGFR1 表达于肾发育过程的多种组织结构中,但具体部位仍存在争议[3,4],FGFR1 在小鼠肾发育中表达的系统研究国内尚未见报道。本研究采用免疫组织化学技术结合体视学方法及免疫印迹法检测 FGFR1 在小鼠肾发育中的表达及其含量变化,以探讨 FGFR1 与肾发育的关系。

1 材料和方法

1.1 组织取材及标本制备

取成年健康昆明小鼠,按雌雄比例 1:1 合笼交配,次日早 8:00 时检查雌鼠妊娠情况,观察到阴道栓者,以中午 12 点计为胚龄 0.5 d（E0.5 d）[5]。孕鼠分笼饲养第 2 周开始每日早晚 8:00 各检查 1 次仔鼠出生情况,以仔鼠出生的最早时间计为生后 0 d（P0 d）。孕鼠分 9 组,每组 4 只,每只孕鼠最多取 2 只胎鼠或仔鼠,分别取 E11.5、13.5、15.5、17.5 d 胎鼠和生后 1、7、14、21、40 d 仔鼠肾,每组共计 8 只胎鼠或仔鼠。孕鼠经 10%水合氯醛麻醉后剖腹取出胎鼠,E11.5 d 全胚固定,E13.5、15.5、17.5 d 取其左肾固定。仔鼠经 10%水合氯醛麻醉后,于腹后壁取出左肾,用排刀法沿横轴将肾脏切开,入 10%甲醛固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡定向包埋,做厚度为 5 μm 的连续切片。取右肾入液氮迅速冷冻,-85 ℃保存,以备免疫印迹测定用。

1.2 实验试剂

兔抗小鼠 FGFR1 单克隆抗体购自北京博奥森生物工程有限公司;PV-6001 兔试剂盒购自中杉金桥生物技术有限公司;二氨基联苯胺（Diaminobenzidine,DAB）显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;聚偏二氟乙烯膜（Polyvinylidene fluoride membrane,PVDF）、SDS、NBT/BCIP、Tween-20、NP-40、PMSF 购自 Sigma 公司。

1.3 免疫组织化学染色

石蜡切片常规脱蜡至水,微波修复抗原 15 min,加入 3% H_2O_2 室温孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶活性,滴加兔抗小鼠 FGFR1 抗体(浓度 1:100)4℃过夜。滴加非生物素标记的山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体 37℃水浴孵育 30 min,DAB 显色 5 min。苏木素复染、脱水、透明、封固,光镜下观察。以磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution,PBS)代替一抗作阴性对照。上述各步骤均用 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH7.4)冲洗。阳性表达为肾小体、远端小管和集合管上皮细胞膜/胞浆呈棕黄色。

1.4 体视学测定

FGFR1 在各期肾小体、远端小管及集合管处的阳性细胞采用体视学方法进行体密度测定。各期肾小体、远端小管及集合管均选取 10 个组织块,对各组织块连续切片,找出具有完整肾断面的起止点,等间隔选取 5 张切片,每张切片按“S”形系统随机选取 5 个阳性视野,在 10×100 倍光镜下应用方格测试系统,点计数法,根据公式 $Vv=\sum Px/\sum Pc$ 测算出 Vv,其中 Vv 为体密度值,表示 FGFR1 在各期肾小体、远端小管及集合管处的相对含量,$\sum Px$ 为方格系统落在各期肾小体、远端小管及集合管处 FGFR1 阳性细胞内的点数,$\sum Pc$ 为方格系统落在参照系（相应的各期肾小体、远端小管及集合管）的点数。

1.5 免疫印迹分析

取冷冻待用右肾组织,置于 1~2 ml 匀浆器中,用干净的剪刀将组织块尽量剪碎,加入 4 倍体积的裂解液 0℃下匀浆、冰上裂解 30 min,冷冻离心机（12 000 r/min）4℃,20 min 后离心去除细胞碎片,取上清液,用考马斯亮兰法测定总蛋白含量。每个样品取 25 μg 与 5×十二烷基硫酸钠上样缓冲液混合,煮沸 5 min,100 g/L 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转硝酸纤维素膜。5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(1:400),二抗(1:700),NBT/BCIP 试剂显色,扫描电泳条带,用 Gene tools 软件分析电泳条带光密度值。

1.6 统计学处理

所有实验数据用均数±标准差表示,采用单因素方差分析进行各组间比较,统计分析过程以 SPSS 16.0 软件完成。

2 结 果

2.1 免疫组织化学染色结果

E11.5 d,FGFR1 在输尿管芽及其周围的生后肾组织微弱表达（图 1）。E 13.5 d,在生肾区输尿管芽、逗号小体（Ⅰ期）及 S 小体（Ⅱ期）均有表达（图 2）。E15.5d 可见 FGFR1 在少量出现的毛细血管袢阶段（Ⅲ期）和较成熟阶段（Ⅳ期）的肾小体表达（图 3）。E17.5 d,FGFR1 除在生肾区表达外,在早期髓质即远端小管和集合管表达（图 4）。P1 d,FGFR1 在生肾区表达减少,在成熟肾小体表达明显。P7 d 至 P14 d,随着髓质发育不断成熟,FGFR1 在远端小管和集合管表达明显（图 5）。P40 d,肾脏发育达到成年水平。在肾单位中,FGFR1 主要表达于肾小体（足细胞及肾小囊壁层上皮）、远端小管（远直小管、远曲小管）。在集合管中,FGFR1 主要表达于髓质集合管且越靠近髓质内带,表达越明显。皮质集合管未见表达。阴性对照（图 6）。

2.2 体视学测量结果

随着胚日龄的增加,FGFR1 在各期肾小体、远端小管及集合管表达的体密度值均逐渐增加,经统计分析,各组间数值的差异具有统计学意义（$P<0.05$）,表明它们的表达量逐渐增加（图 7）。



图 1　E11.5 d 免疫组织化学染色示 FGFR1 在输尿管芽及其周围的生后肾组织内的表达（×1 000）

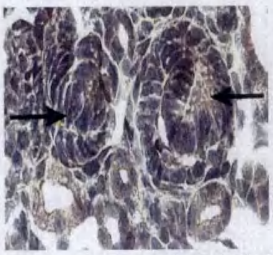


图 2　E13.5 d 免疫组织化学染色示 FGFR1 在逗号小体和 S 小体内的表达（×1 000）

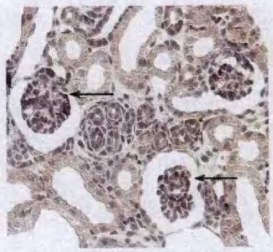


图 3　E15.5 d 免疫组织化学染色示 FGFR1 在肾小体内的表达（×400）

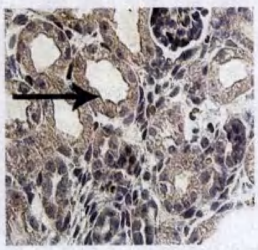


图 4　E17.5 d 免疫组织化学染色示 FGFR1 在远端小管内的表达（×400）

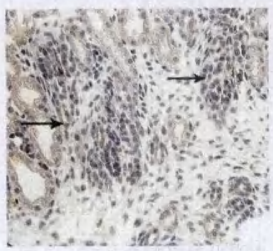


图 5　P7 d 免疫组织化学染色示 FGFR1 在集合管内的表达（×400）

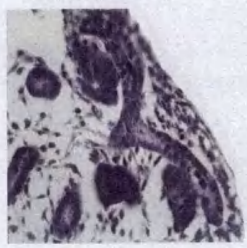


图 6　E13.5 d 阴性对照（×1 000）

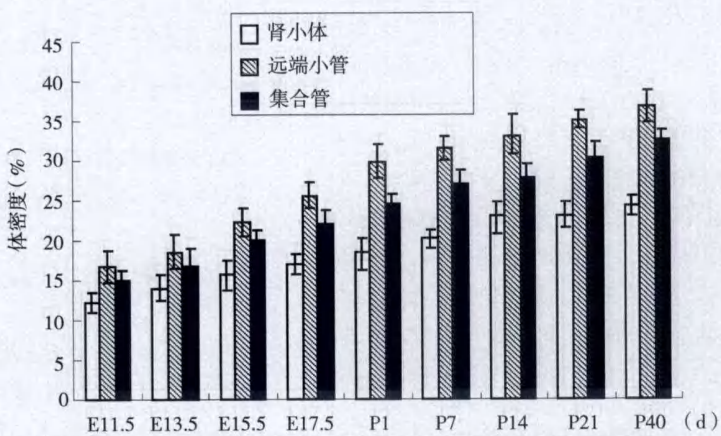


图 7　小鼠发育各阶段肾小体、远端小管和集合管 FGFR1 阳性表达的体密度值（%）

2.3　免疫印迹法测定结果

应用 Gene tools 软件对 FGFR1 蛋白表达电泳条带的分析显示，随着肾的发育，FGFR1 在小鼠肾内表达的光密度值逐渐增加，经统计分析，各组间数值的差异具有统计学意义（$P<0.05$），表明 FGFR1 的表达量逐渐增加（图 8、9）。

3　讨　论

哺乳动物肾脏起源于后肾，是输尿管芽与生后肾组织相互诱导的结果。小鼠 E11.5 d 输尿管芽及分支出现，生后肾组织呈帽状围绕在输尿管芽及分支周围。E13.5 d 输尿管芽分支周围出现小泡体、逗号小体、S 小体，即生肾区。E15.5 d 可见发育各期及成熟肾小体。E17.5 d 早期髓质出现，相当于髓质外带外区。生后 1 d 生肾区逐渐减少，可见发育各期肾小体。Ⅲ、Ⅳ期肾小体明显增加。生后 7 d，皮质生肾区消失，肾小体发育基本成熟，输尿管芽消失，集合管不再分支，髓放线出现，肾乳头可见髓质外带内区。生后 14 d，皮质增厚，髓质可区分为髓质外带内外区。生后 21 d，皮质厚度明显增加，肾乳头内侧可见髓质内带。生后 40 d，肾脏发育达到成年水平。

FGF在体内具有广泛的生物学意义，对胚胎发育起着十分重要的作用。FGF 发挥作用必须与 FGFR 结合，FGFR 有 4 个成员在肾脏不同部位和不同发育阶段均有一定的表达，说明 FGFR 与肾脏发生发育的关系密切。文献报道[6]FGF 存在于胚胎肾组织中，由间充质和输尿管芽分泌，其在间充质、输尿管芽上皮、肾小球、肾小管部位均有表达，与 FGFR 结合形成上游信号通路，对发育有关的多种基因进行调控，是肾单位发育的关键因子，不仅参与间充质 -肾小管上皮细胞转化及存活，还与肾单位上皮细胞数的调节有关[7]，对整个肾发育阶

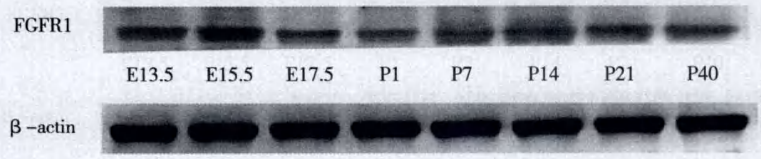


图 8 各组小鼠肾内 FGFR1 表达的电泳结果

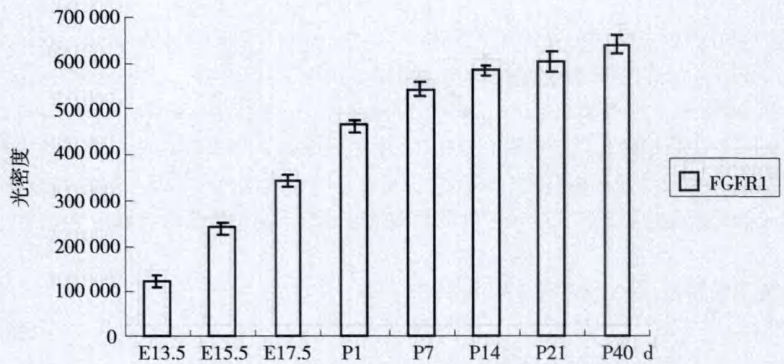


图 9 各组小鼠肾内 FGFR1 表达的光密度值的变化

段均有作用。小鼠成熟肾研究表明所有 FGFR 均在肾脏表达，但只有部分在肾小球表达，其中包括FGFR1，并发现其主要在肾小球足细胞表达。我们的研究表明 FGFR1 在 E11.5 d 小鼠胎鼠输尿管芽和生后肾组织可见微弱表达，这一点表明 FGFR1 在小鼠肾脏早期发育中就开始发挥作用。在 E15.5 d 和生后 1 d，FGFR1 的表达明显增加，此时输尿管芽与生后肾组织及发育中肾小体正处于相互诱导阶段，由此我们推测 FGFR1 的表达同输尿管芽与生后肾组织及发育中的肾小体之间的相互诱导相关。随着肾单位的发育，我们在不同发育阶段的肾小体，即逗号小体、S 小体、毛细血管袢阶段肾小体、未成熟阶段肾小体和成熟肾小体的上皮细胞都观察到 FGFR1 的表达，说明 FGFR1 与促进肾小体的增殖、分化及成熟肾小体功能的维持都密切相关。另外我们还在远端小管、集合管上皮细胞中发现了 FGFR1 的表达，这与前人的研究结果一致[8]，说明 FGFR1 正常表达对肾远端小管及集合管的形态结构发生、发育与功能的维持是很重要的。本实验还应用体视学方法和免疫印迹技术对 FGFR1 的表达量进行了测量，发现从 E11.5 d 的胎鼠开始表达到生后 40 d 的小鼠其表达量逐渐增加，这一结论与 Kim EG[9]的研究结果较为一致，说明 FGFR1 对肾脏的发生、发育、成熟及功能的维持均发挥作用。

总之，FGFR1 与其配体 FGF 结合对肾发育和成熟肾结构与功能维持起重要作用。目前，虽然对 FGF 和 FGFRs 进行了很多的研究也取得了非常大的成就。但是，由于 FGF 家族成分多样、结构复杂、作用广泛，FGF 家族内各种成员的进一步确认、家庭成员之间相互作用的明确、FGF 及其受体在细胞生长、分化方面的作用，FGF 信号传导通路等问题仍需要更多、更深入的研究来证明。

参 考 文 献

[1] Armelin H A. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth[J].Proc Natl Acad Sci USA,1973,70(9):2702-2706.

[2] Yamaji S,Saegusa J,Ieguchi K,et al.A novel fibroblast growth factor-1(FGF1)mutant that acts as an FGF antagonist[J].PLoS One,2010,5(4):1027-1032.

[3] Bates C M.Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development[J].Pediatr Nephrol,2007,22(3):343-349.

[4] Cauchi J,Alcorn D,Cancilla B,et al.Light-microscopic immunolocalization of fibroblast growth factor-1 and-2 in adult rat[J].Kidney Cell,1996,285(2):179-187.

[5] Ozlem P B,Susana D,Samir E.Ontogeny of bradykinin B1 receptors in the mouse kidney[J].Pediatr Res,2009,66(5):519-523.

[6] Liu S,Vierthaler L,Tang W,et al.FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF 23[J].J Am Soc Nephrol,2008,19(12):2342-2350.

[7] Kochoyan A,Poulsen F M,Berezin V,et al.Study of the interaction of the Ig2 module of the fibroblast growth factor receptor,FGFR Ig2,with the fibroblast growth factor 1,FGF1,by means of NMR spectroscopy[J].FEBS Lett,2008,15(23-24):3374-3378.

[8] Strutz F. The role of FGF-2 in renal fibrogenesis[J].Front Bio,2009,1(1):125-131.

[9] Kim E G,Kwon H M,Burrow C R,et al.Physiol.expression of rat fibroblast growth factor receptor 1 as three splicing variants during kidney development[J].Am J Physiol,1993,264(1):66-73.

（责任编辑：张学颖）