

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.22.005

文章编号: 1005-8982 (2018) 22-0027-05

小鼠肾发育中 Slit2 及其受体 Robo1 的表达 *

田娟, 王杨

(锦州医科大学基础医学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 目的 观察并检测 Slit2 及其受体 Robo1 在小鼠肾发育中的表达变化。**方法** 通过免疫组织化学技术系统观察小鼠肾脏 Slit2 和 Robo1 的表达和定位; 应用蛋白印迹技术检测小鼠肾脏 Slit2 和 Robo1 表达的变化规律。**结果** Slit2 和 Robo1 在胚龄 12 d 小鼠肾脏生肾区开始表达; Slit2 在小鼠输尿管芽及其周围的间充质聚集的部位阳性表达, Robo1 在小鼠肾脏生肾区广泛表达, 主要分布于生后肾组织和输尿管芽上皮细胞基底面; 在肾单位发育过程中, Slit2 定位表达于逗号小体阶段和 S 小体阶段, 且表达较强, 在 III 期肾小体阶段、IV 期肾小体阶段及成熟肾小体阶段有微弱表达; Robo1 定位表达于逗号小体阶段、S 小体阶段、III 和 IV 期肾小体阶段, 且表达较强, 在成熟肾小体阶段有微弱表达; Slit2 及其受体 Robo1 在肾脏泌尿小管如近端小管、远端小管及集合管发育过程中均有表达。蛋白印迹检测从小鼠胚龄 14 d 开始, Slit2 表达先递增, 至胚龄 16 d 达峰值, 而后逐渐递减。Robo1 表达从小鼠胚龄 14 d 开始逐渐递减。**结论** Slit2 及其受体 Robo1 参与肾输尿管芽的萌出、输尿管芽与生后肾组织的诱导、肾小体发育及泌尿小管发育和成熟过程。

关键词: Slit2; Robo1; 肾; 发育; 小鼠

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Expressions of Slit2 and its receptor Robo1 during development of mouse kidneys*

Juan Tian, Yang Wang

(Basic Medical College, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To study the expression changes of Slit2 and its receptor Robo1 in the kidneys of mice at different developmental stages. **Methods** The expressions of Slit2 and Robo1 were examined by immunohistochemical staining and Western blot. **Results** Slit2 and Robo1 began to be expressed in the nephrogenic regions of the mouse kidneys at the embryonic age of 12 days. Among them, Slit2 was positively expressed in the ureteric bud and the surrounding mesenchyme but not in other parts of the mice, while Robo1 was widely expressed in nephrogenic zone of the mice, mainly in the metanephrogenic tissue and the basal surface of the ureteric bud epithelium. In the developmental process of nephrons, Slit2 was strongly expressed in the comma body and S body stages, and weakly expressed in the stage III of renal corpuscle, the stage IV of renal corpuscle and the mature stage of renal corpuscle in the mice. Robo1 was strongly expressed in the stages of comma body and S body, the stage III of renal corpuscle and the stage IV of renal corpuscle, but weakly expressed in the mature stage of renal corpuscle in the mice. Both Slit2 and Robo1 were detected in proximal tubules, distal tubules and collecting ducts of the mice. The expression of Slit2 in the mice increased from the 14 day of embryo, reached the peak on the 16th day of embryonic age, and then gradually decreased. The expression of Robo1 protein in the mice gradually decreased from the 14th day of embryonic age. **Conclusions** The expressions of Slit2 and its receptor Robo1 in the renal corpuscles of developing stages and in the development and maturation of the uriniferous tubules in mice suggests that they may

收稿日期: 2017-12-08

* 基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (No: 20170540343); 辽宁省大学生创新创业训练计划项目 (No: 201710160000188)

play an important role in the development of mouse renal corpuscles and uriniferous tubules.

Keywords: Slit2; Robo1; kidney; development; mouse

神经迁移因子(Slit)及其跨膜受体蛋白(Roundabout, Robo)属于神经导向因子,两者最初是在果蝇中被检测到并在其神经系统筛选、克隆成功^[1-2]。在哺乳动物中,Slit有3种亚型,Slit1、Slit2及Slit3。Robo有4种亚型,Robo1、Robo2、Robo3及Robo4。其中,Slit2蛋白广泛表达于神经组织、泌尿系统及呼吸系统^[3-4];Robo1在神经、肺、肝脏、肾脏及心脏中均有表达^[5-6]。实验研究显示Slit和Robo在神经系统广泛表达,并参与神经系统的发育过程;在非神经系统如肺、肾脏、心脏、卵巢、血管、性腺及乳腺等多个器官组织的发育过程中同样发挥重要作用^[7-8]。本研究采用免疫组织化学技术和蛋白印迹技术对Slit2及其受体Robo1在小鼠肾发育中的表达进行系统观察和定量分析,为后续探讨其在肾发育中的作用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 中国昆明系清洁级小鼠90只[成年小鼠12~22g,其余各胚(日)龄未测量体重]购自锦州医科大学实验动物中心[医动字第SCXY(辽)2013-2017号]。

1.1.2 实验试剂 Slit2兔多克隆抗体和Robo1兔多克隆抗体购自上海斯信生物科技有限公司提供,免疫组织化学试剂盒和二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒购自北京中杉金桥生物公司,3-磷酸甘油醛脱氢(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)鼠单克隆抗体购自上海康成生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标本复制 成年雄、雌性小鼠合笼培育孕鼠。共9组,不同时间点各取10只。取胚龄(embryonic days, E)12d胎鼠全胚;胚龄14d至生后日龄(neonatal days, N)40d小鼠肾脏,常规制备石蜡组织切片并提取蛋白。

1.2.2 免疫组织化学染色 切片脱蜡后,依次入100%乙醇2次,90%、80%和70%乙醇各1次,每次10min,流水冲洗。配置枸橼酸钠修复液,加热至沸腾,切片完全浸入修复液,高压修复抗原2min,室温自然冷却。取切片置于湿盒内,滴加3%过氧化氢反应10min。滴加正常山羊血清封闭液反应1h,轻

轻甩去封闭液。滴加Slit2(1:150)或Robo1(1:150)4℃过夜。滴加聚合物辅助剂,37℃30min。滴加辣根酶标记抗兔免疫球蛋白G(Immunoglobulin G, IgG)聚合物,37℃30min。滴加DAB显色液,光学显微镜监测组织显色情况。当镜下可见明显棕黄色时,切片放入蒸馏水以终止显色。苏木精复染细胞核。

1.2.3 蛋白印迹检测 肾脏经超声粉碎机粉碎,加适量裂解液裂解,低温离心30min,抽取上层液体,蛋白定量,分装。安装固定胶板,配胶,灌胶。蛋白样品及内参经加热变性后加样。电泳分离(浓缩胶电压90V,分离胶电压120V)。转膜(电压50V,室温2h)。5%脱脂奶粉封闭1h。一抗Slit2(1:500)或Robo1(1:500)4℃孵育过夜。Tween20-Tris缓冲盐溶液(Tween20-Tris Buffered Saline, TTBS)洗膜30min。二抗(1:2000)室温孵育2h,TTBS洗膜30min。发光溶液A、B各15ml避光混匀,加至膜上,凝胶电泳图像分析仪拍照。以内参为标准,测定条带光密度值。

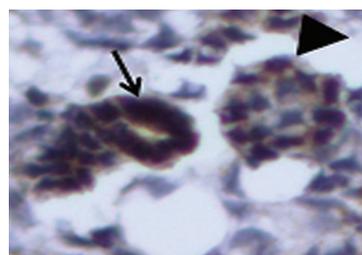
1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 16.0统计软件,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

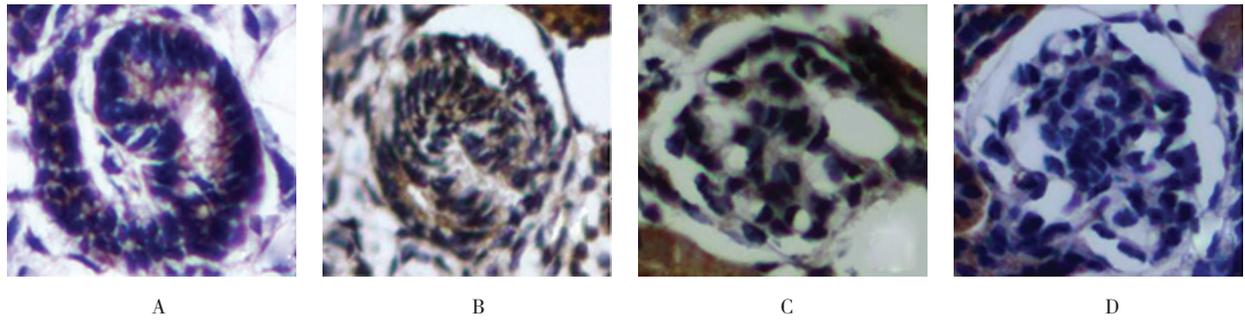
2.1 免疫组织化学染色结果

Slit2在胚龄12d小鼠肾脏的生肾区开始表达。其中,Slit2在小鼠输尿管芽及其周围的间充质聚集的部位阳性表达,其余部位无广泛表达。在肾单位发育过程中,Slit2定位表达于逗号小体阶段和S小体阶段,且表达较强。在Ⅲ和Ⅳ期肾小体阶段及成熟肾小体阶段有微弱的表达。Slit2在肾脏泌尿小管如近端小管、远端小管及集合管发育过程中均有表达。见图1~4。



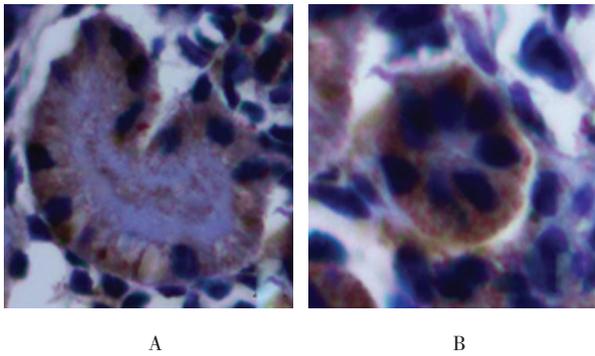
输尿管管芽(→);生后肾组织(▲)

图1 Slit2在输尿管芽和生后肾组织的表达
(免疫组织化学染色×400)



A: 逗号小体; B: S 小体; C: III 期肾小体; D: IV 期肾小体

图 2 Slit2 在肾小体发育各阶段的表达 (免疫组织化学染色 × 400)



A: 近曲小管; B: 远曲小管

图 3 Slit2 在肾小管的表达 (免疫组织化学染色 × 400)

Robo1 在胚龄 12 d 小鼠肾脏的生肾区开始表达。Robo1 在小鼠生肾区广泛表达, 主要分布于生后肾组织和输尿管芽上皮细胞基底面。在肾单位发育过程中, Robo1 定位于逗号小体阶段、S 小体阶段、III 和 IV 期肾小体阶段, 且表达较强, 在成熟肾小体阶段表达微弱。Robo1 在小鼠肾脏泌尿小管如近端小管、远端小管及集合管发育过程中均有表达, 主要分布于泌尿小管上皮细胞的基底面。见图 5 ~ 8。

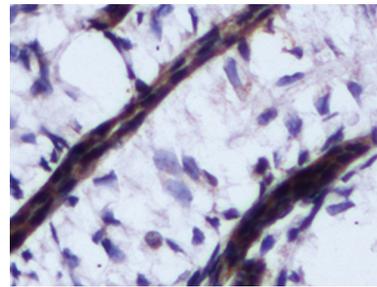
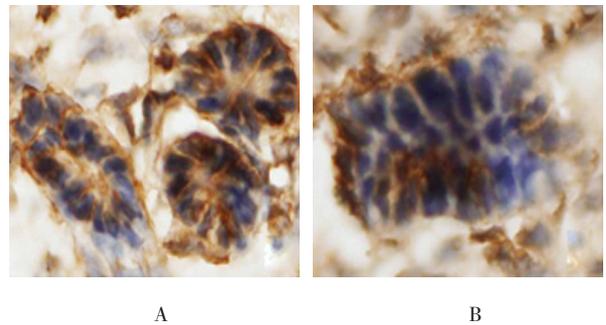
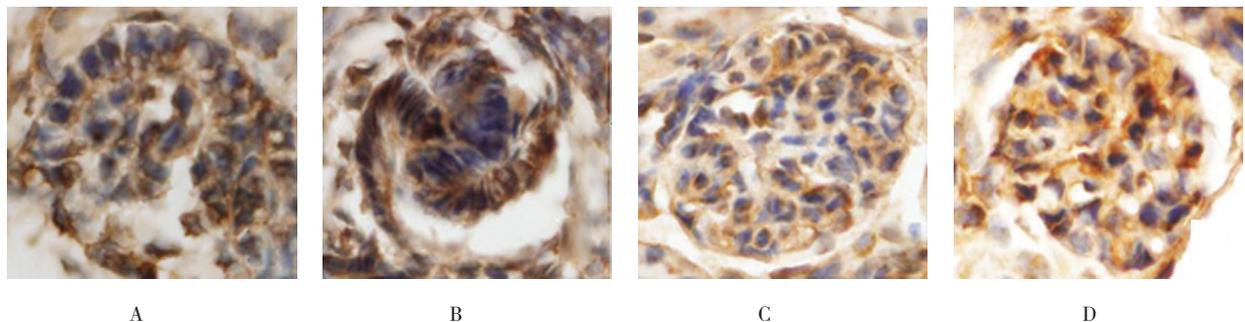


图 4 Slit2 在集合管的表达 (免疫组织化学染色 × 400)



A: 输尿管芽; B: 生后肾组织

图 5 Robo1 在输尿管芽和生后肾组织的表达 (免疫组织化学染色 × 400)

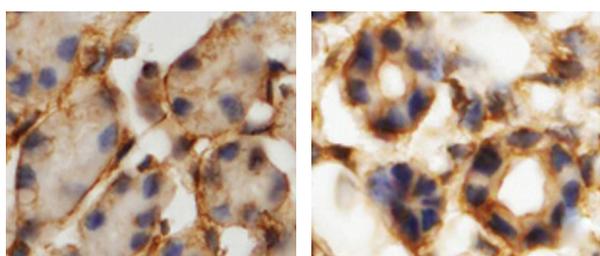


A: 逗号小体; B: S 小体; C: III 期肾小体; D: IV 期肾小体

图 6 Robo1 在肾小体发育各阶段的表达 (免疫组织化学染色 × 400)

2.2 蛋白印迹检测结果

从小鼠胚龄 14 d 开始, Slit2 蛋白表达随着胚(日)龄的增加, 先呈现递增, 胚龄 16 d 达峰值, 随后递减。其中, Slit2 蛋白表达在出生后 1、7 和 40 d 下调较为明显 ($F=16.564, P=0.012$) (见图 9)。Robo1 蛋白表达随着胚(日)龄的增加而递减, 在胚龄 18 d、出生后 1 和 14 d 下调较为明显; 出生后一直维持低水平表达 ($F=13.483, P=0.016$)。见图 10。



A: 近端小管; B: 远端小管

图 7 Robo1 在肾小管内的表达 (免疫组织化学染色 $\times 400$)

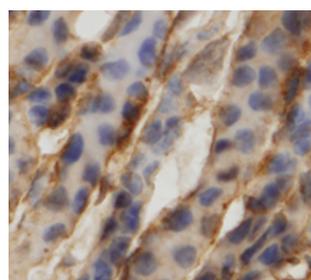
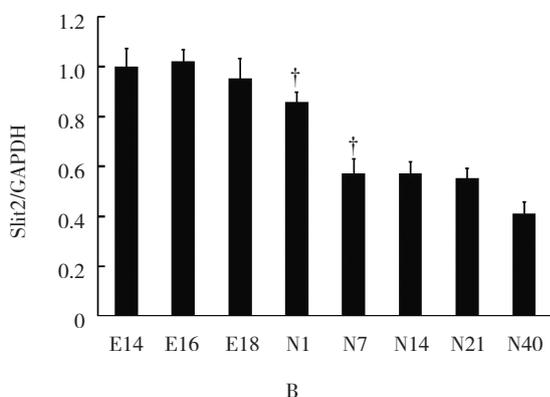
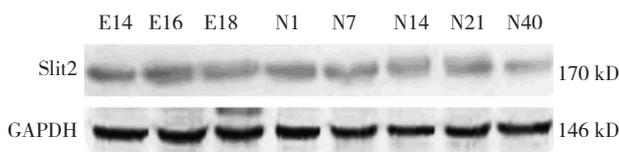
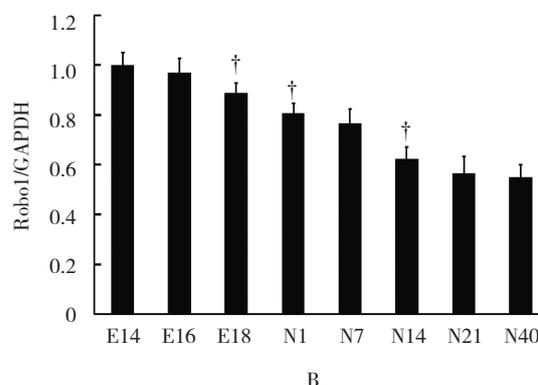
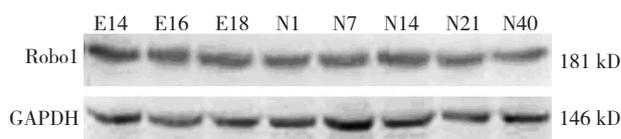


图 8 Robo1 在集合管的表达 (免疫组织化学染色 $\times 400$)



A: 电泳图; B: 柱状图。† 与前组比较, $P < 0.05$

图 9 Slit2 在小鼠肾脏发育各阶段的表达



A: 电泳图; B: 柱状图。† 与前组比较, $P < 0.05$

图 10 Robo1 在小鼠肾脏发育各阶段的表达

3 讨论

本研究显示, Slit2 在胚龄 12 d 小鼠的输尿管芽及输尿管芽周围的间充质聚集部位开始有阳性表达, 其余部位未见表达。而 Robo1 在生肾区广泛表达, 主要分布于生后肾组织和输尿管芽上皮细胞基底面。说明 Slit2 及其受体 Robo1 在小鼠肾脏早期发育即输尿管芽的发生阶段就开始发挥作用。且之前研究报道也称 Slit2 基因敲除小鼠胚胎肾脏表现为多个输尿管芽, 从而产生多个肾脏, 说明 Slit2 对于输尿管芽的萌出起到关键的调控作用, 其表达异常或基因缺失会影响输尿管芽的正常发生过程^[9-10]。在肾小体发育过程中, Slit2 及其受体 Robo1 均有阳性表达。Slit2 定位表达于逗号小体阶段和 S 小体阶段, 且表达较强; 在 III 和 IV 期肾小体阶段及成熟肾小体阶段有微弱的表达。Robo1 定位表达于逗号小体阶段、S 小体阶段、III 和 IV 期肾小体阶段, 且表达较强, 在成熟肾小体阶段有微弱的表达。两者的表达部位一致, 提示 Slit2 及其受体 Robo1 参与调控肾小体发生发育的全部过程。另有报道称 Robo 受体家族中的 Robo2 表达于成熟肾小体的足细胞^[11]。在糖尿病肾病患者肾小球中 Robo2 表达量下调, 提示 Robo2 可能与肾脏肾小体足细胞功能的维持有关, 参与调控足细胞的黏附力^[12]。而本研究结果显示 Robo1 未见在足细胞表达, 表明其可能对足细胞的发育和功能作用不大。Slit2 和 Robo1 在肾脏泌尿小管(近端、远端小管及集合管)发育和成熟阶段均明显表达。

可见, Slit2 及其受体 Robo1 不仅参与肾小管和集合管的形态发生发育过程, 对其功能维持也起到关键的调控作用。半定量分析结果表明, Slit2 蛋白表达量随着胚(日)龄的增加, 先呈现递增, 胚龄 16 d 达峰值, 随后递减。Robo1 蛋白表达随着小鼠胚(日)龄的增加而递减, 两者略有差异, 但生后两者的变化趋势基本一致。蛋白印迹检测结果提示 Slit2 及其受体 Robo1 在生后表达较低, 这可能与肾脏中肾小体的发育规律有关。对小鼠肾脏而言, 肾小体的发育成熟主要集中在胚龄 14 d 到生后 7 d。在生后 7 d, 随着生肾区的消失, 肾小体发育成熟, 数目不再增加^[13]。而本研究结果提示, Slit2 和 Robo1 主要在发育过程中的肾小体表达明显, 而在成熟肾小体微弱表达。可见, Slit2 和 Robo1 的蛋白表达变化规律与肾小体的发育规律是一致的。前期试验证实, 胶质细胞系源性神经营养因子 (glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF) /GDNF 家族受体 $\alpha 1$ (GDNF family receptor $\alpha 1$, GFR $\alpha 1$) /受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RET) 信号通路参与调控小鼠肾脏发育^[14]。根据文献报道, GDNF 调控输尿管芽发生、发育。而在 Robo2 小鼠体内后肾间充质出现 GDNF 表达区域扩大, 多个输尿管芽发生的现象^[15]。提示这 2 个信号系统可能存在关联, Slit/Robo 信号通路是否通过调控 GDNF 的表达来影响肾脏的早期发育, 这些都需要进一步的实验进行验证。

综上所述, Slit2 及其受体 Robo1 在肾脏发生和发育过程中有广泛表达, 如后肾发生阶段出现的输尿管芽、生后肾组织、各期肾小体、发育及成熟阶段的泌尿小管 (近端小管、远端小管及集合管)。可见, Slit2 及其受体 Robo1 对于肾脏的发生阶段、中后期的分化阶段及成熟后的功能维持阶段均可发挥一定的作用。结合相关文献报道, 有理由推测 Slit2 及其受体 Robo1 是肾脏发生、发育的必备调控因素, 其表达异常会导致肾发育畸形及功能异常, 从而引发相关临床症状。本研究不仅为阐明肾发育畸形的可能机制提供理论依据, 同时也为肾发育畸形的临床诊断、治疗和预防提供思路。另外, 本研究结果对 Slit2 及其受体 Robo1 在肾脏的表达进行系统观察和定位, 也为后续的深入探究 Slit2 及其受体 Robo1 的功能提供了形态学依据。相信随着研究的不断推进, 对肾发育畸形的发病机制将有更全面的认识和了解。

参 考 文 献:

- [1] ANDERSON K V, NUSSLEIN-VOLHARD C. Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA[J]. *Nature*, 1984, 311(5983): 223-227.
- [2] CARR L, PARKINSON D B, DUN X P. Expression patterns of Slit and Robo family members in adult mouse spinal cord and peripheral nervous system[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172736.
- [3] GUIJARRO-MUNOZ I, CUESTA A M, ALVAREZ-CIENFUEGOS A, et al. The axonal repellent Slit2 inhibits pericyte migration: potential implications in angiogenesis[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(4): 371-378.
- [4] FRIOCOURT F, CHEDOTAL A. The Robo3 receptor, a key player in the development, evolution and function of commissural systems[J]. *Dev Neurobiol*, 2016, 318(4): 371-378.
- [5] MARKO T A, SHAMSAN G A, EDWARDS E N, et al. Slit-Robo GTPase-Activating Protein 2 as a metastasis suppressor in osteosarcoma[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39059.
- [6] GARA R K, KUMARI S, GANJU A, et al. Slit/Robo pathway: a promising therapeutic target for cancer[J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(1): 156-164.
- [7] EVANS T A. Embryonic axon guidance: insights from *Drosophila* and other insects[J]. *Curr Opin Insect Sc*, 2016(8): 11-16.
- [8] JIN X, SHIN Y J, RIEW T R, et al. Increased expression of slit2 and its robo receptors during astroglial scar formation after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(12): 3373-3385.
- [9] DEFREITAS M J, MATHUR D, SEEHERUNVONG W, et al. Umbilical artery histomorphometry: A link between the intrauterine environment and kidney development[J]. *J Dev Orig Health Dis*, 2017, 8(3): 349-356.
- [10] CHANG J, LAN T, LI C, et al. Activation of Slit2-Robo1 signaling promotes liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(6): 1413-1420.
- [11] WAINWRIGHT E N, WILHELM D, COMBES A N, et al. Robo2 restricts the nephrogenic field and regulates Wolffian duct-nephrogenic cord separation[J]. *Dev Biol*, 2015, 404(2): 88-102.
- [12] FAN X, YANG H, KUMAR S, et al. Slit2/Robo2 signaling pathway inhibits nonmuscle myosin IIA activity and destabilizes kidney podocyte adhesion[J]. *JCI Insight*, 2016, 1(19): e86934.
- [13] CHATURVEDI S, ROBINSON L A. Slit2-Robo signaling in inflammation and kidney injury[J]. *Pediatr Nephrol*, 2015, 30(4): 561-566.
- [14] 郭芳, 田娟, 赵越超. 小鼠肾发育中胶质细胞系源性神经营养因子家族受体 $\alpha 1$ 和受体酪氨酸激酶的表达 [J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(30): 13-17.
- [15] YUEN D A, ROBINSON L A. Slit2-Robo signaling: A novel regulator of vascular injury[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2013, 22(4): 445-451.

(张西倩 编辑)