

· 基础研究 ·

胎猪肾脏发育不同时期相关信号分子的表达

刘曼菱,赵丽华,张曼玲,金 永,王晨宇,尤志欢,张 红,李荣凤*

南京医科大学江苏省异种移植重点实验室,心血管病靶向干预研究重点实验室,心血管病转化医学协同创新中心,江苏 南京 211166

[摘要] 目的:明确不同时期胎猪的肾脏发育情况,并研究胎猪肾脏发育相关信号分子的表达。方法:收集不同时期(妊娠21.5、27.5、35.0、45.0、75.0及110.0 d)胎猪肾脏组织,应用HE法观察不同时期胎猪肾脏的组织结构。通过实时荧光定量PCR和Western blot分别检测肾脏发育相关信号分子(Pax2、Pax8、Six2、Six1、Sall1和Bmp4)的mRNA和蛋白表达水平,并通过免疫组织化学检测Pax2在不同时期胎猪肾脏的表达定位情况。结果:27.5 d胎猪的后肾已经开始发育;35 d早期肾小体已经出现,肾小管也开始发育;45 d观察到近皮质不成熟的肾小体和近髓质成熟的肾小体;75 d肾单位数目显著增加,观察到肾椎体、肾乳头和肾盂;110 d肾脏基本发育成熟,皮髓质分界明显,仍有新的肾单位产生。Pax2、Pax8、Six2、Six1、Sall1和Bmp4在胎猪75 d的肾脏中mRNA和蛋白表达量高于35 d。Pax2广泛表达于输尿管芽、后肾间充质、帽状间充质、肾小囊体、逗号形体、S形体以及肾小管,并在后肾发育过程中持续表达。结论:27.5 d时胎猪后肾已经开始发育,110 d基本发育成熟。Pax2、Pax8、Six2、Six1、Sall1和Bmp4等信号分子在胎猪肾脏发育过程中均有不同程度表达,其中Pax2可能是胎猪肾脏发育的关键调控分子。

[关键词] 肾脏发育;Pax2;猪**[中图分类号]** Q954.4**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)06-822-07

doi:10.7655/NYDXBNS20190607

Expression of related signaling molecules at different stages of kidney development in fetal pig

Liu Manling, Zhao Lihua, Zhang Manling, Jin Yong, Wang Chenyu, You Zhihuan, Zhang Hong, Li Rongfeng*

Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Key Laboratory of Targeted Intervention of Cardiovascular Disease, Collaborative Innovation Center for Cardiovascular Disease Translational Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To clarify the developmental status of porcine fetal kidney at different stages, and to study the expression of signaling molecules related to the development of porcine fetal kidney. **Methods:** The kidney tissues of porcine fetuses at different stages (fetuses on post-implantation days 21.5, 27.5, 35.0, 45.0, 75.0 and 110.0) were collected. The histological structure of pig fetal kidneys was observed by HE staining. The mRNA and protein expression levels of factors related to renal development signaling molecules (Pax2, Pax8, Six2, Six1, Sall1 and Bmp4) were detected by quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot, respectively. The expression and localization of Pax2 at different stages of fetal kidney were detected by immunohistochemistry. **Results:** The metanephros of fetal pig initiated its development starting by the 27.5th day. The early renal corpuscles appeared on the 35th day, and the renal tubules began to develop. On the 45th day, the immature glomeruli in the cortex region and the proximal matured renal corpuscles in the medulla region could be detected. The number of nephrons on the 75th day increased significantly, and kidney pyramid, renal papillae and renal pelvis were observed at this stage. On the 110th day, kidney was basically mature, the cortex and medulla could be distinguished clearly, and new nephrons kept to be produced. The mRNA and protein expression levels of Pax2, Pax8, Six2, Six1, Sall1 and Bmp4 on 75 d were higher than that on 35 d. Pax2 was widely expressed in ureteric bud, metanephric mesenchyme, cap mesenchyme, renal vesicles, comma-shaped bodies, S-shaped bodies and renal tubule, and is continuously expressed

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31371487)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lirongfeng@njmu.edu.cn

during the development of the metanephros. **Conclusion:** The development of metanephros of fetal pig starts the 27.5th day and basically reaches maturation on the 110th day. The signaling molecules such as Pax2, Pax8, Six2, Six1, Sall1 and Bmp4 were expressed along different stages during the kidney development, and Pax2 may be a key regulator of porcine fetal kidney development.

[Key words] nephrogenesis; Pax2; pig

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(06): 822-828]

尿毒症,也称终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD),是各种慢性肾脏疾病的终末阶段,由于肾单位被大量破坏(>90%),除水、电解质、酸碱平衡紊乱和肾脏内分泌功能失调外,还出现内源性毒性物质蓄积而引起的一系列自体中毒症状。肾移植是目前治疗尿毒症最有效的方法,然而可供移植的肾脏资源却十分有限。因此,基于再生医学即现代医学和生物学技术手段,寻求可用于人类移植的肾脏器官的新来源,有望成为解决这一难题的新途径。

利用诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)和囊胚互补技术实现器官种间再生,为移植器官的来源提供了新思路。2010年,Naikauchi团队将大鼠的iPSC注射到胰腺缺失的Pdx1^{-/-}小鼠囊胚后移植到小鼠子宫内,成功创造出拥有大鼠胰腺的嵌合小鼠^[1]。随后,该团队又通过囊胚互补实现了Sall1^{-/-}肾脏发育受阻小鼠的肾脏再生^[2]。Matsunari等^[3]将该技术应用到大动物上,在胰腺缺失的猪体内实现了胰腺再生,证明了在猪体内实现功能性器官再生的可能性。猪被认为是人类最佳的异种器官供体,要利用人的iPSC在猪体内再生人源化肾脏,前提是找到猪肾脏的“发育龕”,即找到控制胎猪肾脏发育的关键基因,获得肾脏缺失的猪模型。

哺乳动物的肾脏发育起源于中胚层,分为3个阶段:前肾、中肾和后肾。前两个阶段形成瞬时结构,后肾发育为最终的肾脏。后肾的发育主要依赖于输尿管芽(ureteric bud, UB)与后肾间充质(metanephric mesenchyme, MM)的一系列相互诱导作用。MM通过释放信号因子诱导沃尔夫管(Wolffian duct, WD)延伸出UB。随后,UB入侵MM并在相关信号分子的作用下生成一系列分支,最终发育成肾脏的集合系统。与此同时,新形成的UB会诱导围绕在其顶端的MM浓缩聚集,将MM转化为帽状间充质(cap mesenchyme, CM)。CM经历间充质-上皮转化后相继分化为肾小囊体(renal vesicles, RVs)、逗号形体(comma-shaped body, C)和S形体(S-shaped body, S),最终形成成熟的肾单位。多种转录

因子和信号分子共同调控这一过程^[4]。本研究通过对不同时期的胎猪肾脏进行HE染色分析,探究胎猪肾脏发育的关键时间点,并通过实时荧光定量PCR、Western blot和免疫组织化学分析了影响肾脏发育的信号分子的表达情况,为后续猪肾缺失模型的构建以及人源化肾脏的再生奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

妊娠21.5、27.5、35.0、45.0、75.0、110.0 d的长白胎猪由南京医科大学江苏省异种移植重点实验室猪场提供。RNeasy[®] Micro Kit (151045043, Qiagen公司,德国);苏木素染液和伊红染液(武汉塞维尔生物科技有限公司);RIPA裂解液和PMSF(上海碧云天生物技术有限公司);反转录试剂盒、ChamQ SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司);组化试剂盒DAB显色剂(K5007, Dako公司,丹麦);荧光定量PCR仪(Roche公司,瑞士);TGX Stain-Free[™] FastCast[™] Acrylamide Kit、Western blot电泳仪及转膜仪、凝胶成像仪(Bio-Rad公司,美国);高速制冷离心机(FRESCO17)、Pierce[™] BCA Protein Assay Kit、ECL Western blot Detection Reagents(Thermo公司,美国);石蜡切片机(Thermo Fisher Scientific公司,美国);-80℃超低温冰箱(Sanyo公司,日本);引物序列由南京思普金公司合成。

1.2 方法

1.2.1 不同时期胎猪的获得及取材

对妊娠21.5、27.5、35.0、45.0、75.0、110.0 d的孕猪,分别进行剖腹产手术取出胎猪。将21.5 d和27.5 d的胎猪整体固定在4%多聚甲醛溶液中,整体包埋。35、45、75、110 d的胎猪立即解剖,取出肾脏,分成几部分进行处理,将准备提取蛋白和RNA的样品保存于-80℃,用于石蜡包埋切片的部分固定于4%多聚甲醛溶液中。

1.2.2 病理切片的制作

将整体胎猪或肾脏组织在4%多聚甲醛溶液中固定24 h后,依次放入50%酒精30 min,75%酒精

1 h, 85%酒精 2 h, 95%酒精 I 1 h, 95%酒精 II 1 h, 无水乙醇 I 30 min, 无水乙醇 II 30 min, 乙醇与二甲苯 1:1 比例配制的液体 20 min, 二甲苯 I 10 min, 二甲苯 II 10 min, 蜡 I、II、III 各 1 h。将浸好蜡的组织放在预热的石蜡包埋框中, 调整好位置, 用包埋机进行包埋。包埋好的蜡块装载到石蜡切片机上进行切片, 每片 5 μm。然后将切好的切片置于 46 °C 的摊片机中, 待组织片平整后用载玻片捞起, 放入 60 °C 烘片机烘片。切片中的石蜡烘化后取出, 常温保存。

1.2.3 HE 染色

将 21.5 d 和 27.5 d 的整体胎猪切片及 35、45、75 和 110 d 的胎猪肾脏切片依次放入二甲苯 I 脱蜡, 100%、90%、80%、70%酒精各 5 min, 去离子水 5 min 洗 2 遍。然后用苏木素染色 3 min, 接着用自来水冲洗, 再用 1% 盐酸酒精 (HCl:70%乙醇为 1:100) 中分化数秒, 自来水冲洗, 1% 氨水返蓝 30 s, 自来水冲洗。伊红染色 1~3 min 后, 切片脱水封片, 依次放入 95%酒精 I 5 min, 95%酒精 II 5 min, 无水乙醇 I 5 min, 无水乙醇 II 5 min, 二甲苯 I 10 min, 二甲苯 II 10 min, 中性树胶封片。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

使用 RNeasy® Micro Kit 试剂盒分别提取 35 d 和 75 d 胎猪肾脏组织的总 RNA, 将 RNA 反转录为 cDNA。之后利用实时荧光定量 PCR 方法检测 35 d 和 75 d 肾脏发育相关基因 (Pax2、Pax8、Six2、Six1、Sall1、Bmp4) 的 mRNA 的表达水平。以 GAPDH 作为内参对照, 结果采用 2^{-ΔCt} 值进行计算。引物序列、退火温度及产物大小见表 1。

1.2.5 Western blot

用 RIPA 裂解液 (每 1 mL RIPA 裂解液中含有 10 μL PMSF) 分别提取 35 d 和 75 d 胎猪肾脏组织蛋白。根据 BCA 法测定各蛋白浓度后, 加入 SDS-

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物及其相关信息

Table 1 Primers and information for quantitative real-time PCR

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火 产物	
		温度 (°C)	大小 (bp)
Pax2	F:TACAAGCGACAGAACCCCT	60	400
	R:GGACTGAGCCCTCGGACA		
Pax8	F:AAGGTGGTGGAGAAGATCGG	60	173
	R:ATGGGGAGGTTGAATGGTTG		
Six2	F:AACCCCTACCCCTCACCC	60	236
	R:GGCGTCTTCTCGTCCTCC		
Six1	F:GGCTGTTGCGGGAGTGTA	64	191
	R:TGCTTGTGGAGGAGGAGTT		
Sall1	F:CCAGGAGAACCCCAACAG	60	226
	R:CCAGGAGAACCCCAACAG		
Bmp4	F:AGTCTGGAGAGGAGGAGGAA	64	165
	R:GGTTAAAGAGGAAACGAAAAGCA		
GAPDH	F:CTCAACGACCACTTCGTCAA	60	328
	R:TCTGGGATGGAAACTGGAAG		

PAGE 蛋白上样缓冲液, 混匀后 95 °C 加热 10 min, 分装保存在 -80 °C 备用。使用 TGX Stain-Free™ Fast-Cast™ Acrylamide Kit 试剂盒, 配制 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶。分别取 10 μg 蛋白进行电泳, 之后采用湿转法, 将蛋白转到 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h 后, 孵育一抗 (表 2) 4 °C 过夜。第 2 天用 TBST 洗膜 3 遍, 每遍 10 min, 之后孵育二抗 (表 2)。室温 90 min, TBST 洗膜 3 遍, 每遍 10 min。加适量 ECL 显色液于凝胶成像系统中曝光拍照。

1.2.6 免疫组织化学实验

切片在 60 °C 烘箱烘片 1 h 后脱蜡, 依次放入二甲苯 I 15 min, 二甲苯 II 15 min, 100%酒精 I 5 min, 100%酒精 II 5 min, 95%酒精 I 5 min, 90%酒精 II 5 min, 80%酒精 5 min, 70%酒精 5 min, 去离子水

表 2 一抗及二抗信息

Table 2 Information of primary antibody and secondary antibody

名称	一抗	二抗
Pax2	Rabbit anti-Pax2 (ab79389, Abcam 公司, 英国)	Goat anti-Rabbit IgG (ab6721, Abcam 公司, 英国)
Pax8	Rabbit anti-Pax8 (ab191870, Abcam 公司, 英国)	Goat anti-Rabbit IgG (ab6721, Abcam 公司, 英国)
Six2	Rabbit anti-Six2 (1156-1-AP, Proteintech 公司, 美国)	Goat anti-Rabbit IgG (ab6721, Abcam 公司, 英国)
Six1	Rabbit anti-Six1 polyclonal antibody (D4A8K, Cell Signaling Technology 公司, 美国)	Goat anti-Rabbit IgG (ab6721, Abcam 公司, 英国)
Sall1	Mouse anti-Sall1 (PP-K9814-00, RD Systems 公司, 美国)	Goat anti-Mouse IgG (sc-2005, Santa Cruz 公司, 美国)
Bmp4	anti-Bmp4 (sc-6896, Santa Cruz 公司, 美国)	Rabbit anti-Goat IgG (AB33151, Biowold Technology 公司, 美国)

5 min 洗2遍。在3% H₂O₂的甲醇中浸泡15 min 去除内源性的过氧化氢酶,用PBST洗3遍,之后放入柠檬酸缓冲液(0.3 g 柠檬酸,4 g 柠檬酸三钠,1 L 去离子水)中在高压灭菌锅中进行抗原修复3 min。缓慢降至室温后取出,用1% BSA 封闭2 h。封闭结束后,孵育一抗 Rabbit anti-Pax2(1:500),4 ℃ 过夜。第2天用PBST洗3遍,每遍5 min。之后孵育二抗 Goat anti-Rabbit IgG(1:1 000),室温2 h。用PBST洗3遍,每遍5 min。DAB 显色后用 ddH₂O 冲洗。之后经苏木素染色、乙醇脱水、二甲苯透明后用中性树胶封片。

1.3 统计学方法

所有计量数据均使用 GraphPad 5.01 软件进行统计学分析,所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用

t 检验进行比较, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时期胎猪肾脏的形态学分析

为研究不同时期胎猪肾脏的发生发育规律,对妊娠 21.5、27.5、35.0、45.0、75.0、110.0 d 的胎猪进行解剖,并收集肾脏。在 21.5 d 和 27.5 d 的胎猪中,未发现典型肾脏形态的肾脏器官。在 35、45、75 和 110 d 的胎猪中,均解剖获得了典型肾脏形态的肾脏器官。胎猪肾脏形如蚕豆,表明光滑。随着胚胎发育,胎猪肾脏体积逐渐增大,35 d 肾脏长 4.0 mm,45 d 肾脏长 8.5 mm,75 d 肾脏长 24.5 mm,110 d 肾脏长 36.6 mm(图 1)。

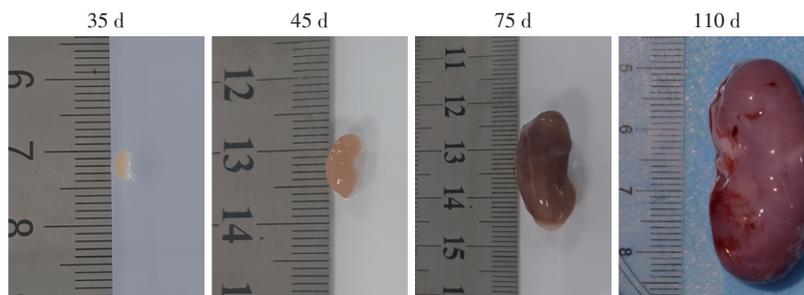


图1 不同时期胎猪肾脏的形态图

Figure 1 Photograph of pig fetal kidney at different stages

2.2 不同时期胎猪肾脏的组织学分析

对 21.5、27.5、35.0、45.0、75.0 和 110.0 d 的胎猪肾脏石蜡包埋切片后行 HE 染色。结果显示,胎猪在 21.5 d 后肾还没有开始发育,未见典型的肾脏形态。27.5 d 时胎猪的后肾已经开始发育,输尿管芽从中肾管中延伸出来,高密度的后肾间充质在输尿管芽壶腹末端聚集。35 d 肾长成典型的蚕豆型;皮质部分可见广泛的生肾区,生肾区后肾间充质细胞在输尿管芽的壶腹附近聚集压缩形成帽状间充质,开始间充质-上皮转化,可见肾小囊体和少数 S 形体;出现早期肾小体,包含有毛细血管祥期血管球和原始肾小囊;输尿管芽扩张分支,肾小管开始发育,原始肾盂长出。45 d 可观察到皮质浅层未成熟的肾小体和位于皮质深层的较成熟的肾小体;肾小囊体位于生肾区的浅表部分,而在生肾区较深部分可见 S 形体;在生肾区下方,小的血管球被丰富的间充质细胞包裹,皮髓质连接处的较大血管球有明显的毛细血管簇和更宽阔的肾小囊腔;肾小管数量增多,结构进一步完善。75 d 肾皮质明显变得更宽并且

包含更多血管球,血管球毛细血管数量增多,肾小囊腔增大;集合管形成,管腔较大;近髓肾单位发生较早,随着集合小管末端不断向皮质浅层生长并分支,不断诱导后肾间充质形成浅表肾单位;生肾区明显变薄,可见少量的肾小囊体和较多的 S 形体;近端小管和远端小管结构更加复杂完善,数量显著增加;可以观察到肾椎体、肾乳头、肾大盏、肾小盏和肾盂。110 d 肾脏发育基本成熟,结构基本完善;肾小体形态清晰完整,肾小管在肾小体周围紧密排列,周围间质细胞减少;皮质髓质分界清楚,可观察到髓放线;生肾区有少量 S 形体,仍有新的肾单位形成(图 2)。

2.3 胎猪肾脏发育相关基因的表达情况

提取胎猪 35 d 和 75 d 肾脏组织总 RNA 和总蛋白,分别用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 方法检测肾脏发育相关基因 Pax2、Pax8、Six2、Six1、Sall1 和 Bmp4 的 mRNA 及蛋白表达情况,并通过灰度值进行定量分析。结果显示,35 d 的胎猪肾脏中 Pax2、Pax8 和 Sall1 的 mRNA 和蛋白表达较弱,Six2 和 Six1 几乎不表达;75 d 的胎猪肾脏中 Pax2、Pax8、Six2、

Six1 和 Sall1 的 mRNA 和蛋白表达均显著增加;Bmp4 在 35 d 的胎猪肾脏中已有表达,且 75 d 表达量上升(图 3、4)。我们选择 Pax2 进行后续实验。

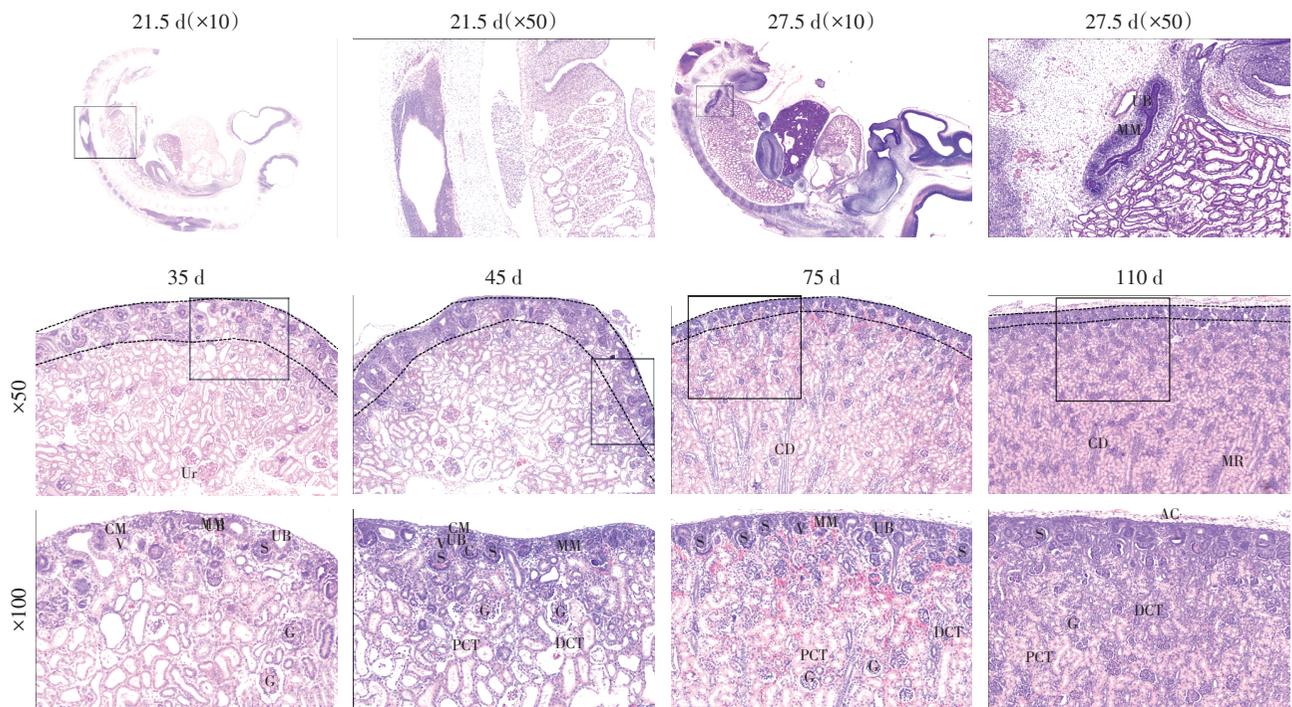
2.4 Pax2 在胎猪后肾中的表达情况

为进一步探究 Pax2 在胎猪后肾发育过程中的表达情况并定位其表达区域,对 27.5 d 和 35、45、75、110 d 胎猪肾脏组织进行免疫组织化学分析。研究发现,Pax2 在 27.5 d 即后肾发育起始阶段就已经开

始表达,输尿管芽和浓缩的后肾间充质中均可见 Pax2 的表达。在 35、45、75、110 d 时,Pax2 表达于输尿管芽、肾小囊体、逗号形体、S 形体和肾小管中(图 5)。证明 Pax2 是胎猪肾脏发育过程中调控输尿管芽和后肾间充质分化发育的关键基因。

3 讨论

不同物种之间肾发生的时间和空间都存在着



MM:后肾间充质;UB:输尿管芽;CM:帽状间充质;V:肾小囊体;C:逗号形体;S:S形体;G:肾小球;PCT:近曲小管;DCT:远曲小管;CD:集合管;MR:髓放线;AC:脂肪囊;虚线区域为生肾区。

图2 HE染色检测不同时期胎猪肾脏的发育情况

Figure 2 HE staining detection of the development of pig fetal kidney at different stages

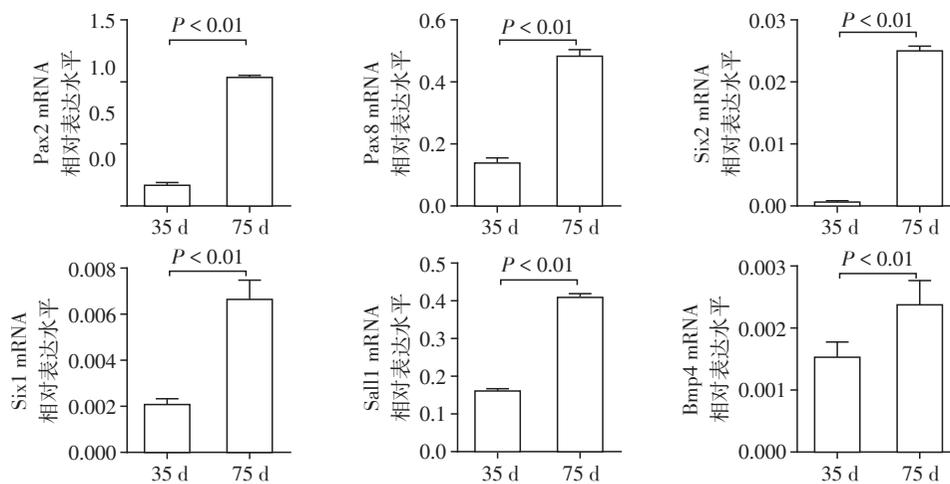


图3 实时荧光定量PCR检测胎猪肾脏发育相关基因的mRNA表达情况

Figure 3 Detection of mRNA expression of pig fetal kidney development related genes by quantitative real-time PCR

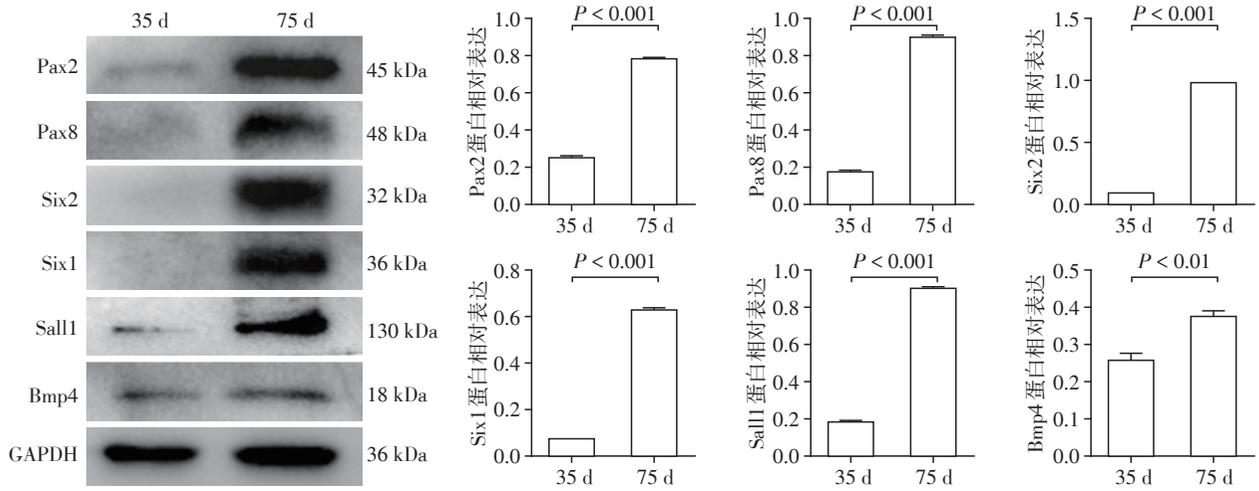


图4 Western blot 检测胎猪肾脏发育相关基因的蛋白表达情况

Figure 4 Western blot analysis of protein expression in pig fetal kidney development related genes

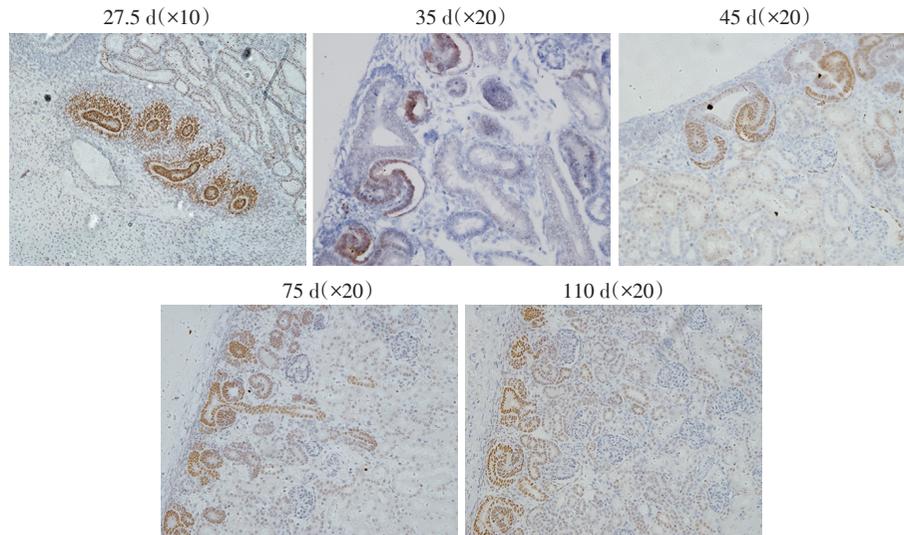


图5 免疫组化检测 Pax2 在胎猪肾脏发育不同时期的表达及定位情况

Figure 5 Immunohistochemical detection of Pax2 expression and localization in different stages of pig fetal kidney development

显著差异,研究显示人后肾发育起始于胚胎第5周初。妊娠期第28天(小鼠第11天),输尿管芽从中肾管末端延伸出来,入侵后肾间充质并反复分支,同时诱导后肾间充质形成帽状间充质,进而发生间充质-上皮转化,依次形成肾小囊体(13~19周)、S形体(20~24周)和毛细血管祥期血管球(25~29周),最终发育为成熟的肾小体^[5]。妊娠第8周时,近、远端小管已经开始分化发育。妊娠12周,胎儿髓祥形成,已有成熟肾小管生成。妊娠36周,输尿管芽的壶腹停止生长并消失,不再有新的肾单位形成^[6]。猪在解剖学、生理特点和疾病等都与人比较接近^[7],明确猪肾脏发育的过程对肾脏缺陷猪模型的构建以

及人源化肾脏的种间再生具有十分重要的意义。因此,本研究对不同时期胎猪的肾脏进行组织学分析。研究发现,胚胎期27.5 d猪后肾已经开始发育,可见输尿管芽和后肾间充质;35 d出现肾小体,肾小管开始发育;75 d可见集合管、肾椎体、肾乳头、肾大盏、肾小盏和肾盂,并且随着肾脏的发育,肾单位数量逐渐增多,结构逐渐成熟,生肾区逐渐变小;110 d肾脏发育基本成熟,皮髓质分界明显,但仍有新的肾单位形成。直到仔猪出生,肾发生仍在继续。

哺乳动物的肾脏发育受多种信号分子的调控。其中影响后肾发育关键的信号分子有 Pax2、Pax8、Six2、Six1、Sall1 和 Bmp4 等。Pax2 是启动原始

肾脏发育重要的信号分子,其在前肾和中肾的间充质原基和上皮均有表达。后肾发育过程中,Pax2表达于肾祖细胞、集合管和发育中的肾元的所有上皮细胞中。Pax2纯合突变的小鼠会导致肾脏、输尿管和生殖道的缺陷^[8]。Pax8的表达开始于肾小囊体期,与Pax2共同维持肾元的分化。Pax8突变的胚胎在甲状腺发育方面有严重缺陷,但能形成正常肾脏^[9]。Pax2/Pax8双基因缺失会导致严重的肾脏缺失。Six2是帽状间充质特异性的标志物,其失活会导致间充质细胞过早和异位分化为上皮细胞,最终导致严重的肾脏发育不全^[10]。Six1是一种同源框蛋白,其在未诱导的后肾间充质中的表达,是肾脏早期发育所必需的。Six1突变会导致严重的肾脏缺陷^[11]。Sall1对后肾的发育也有着重要的作用,且表达在后肾间充质中。Sall1的存在依赖于Six1的存在。如果没有Six1,Sall1也不表达。缺乏Sall1会使输尿管芽从中肾管中生长失败,导致肾发育不全^[12]。Bmp4被认为是输尿管芽生长的负调控因子。Bmp4表达于覆盖中肾管的基质细胞中,先于输尿管芽的生长。Bmp4失活的胚胎在早期发育过程中死亡,其杂合子突变表现为输尿管芽的异位^[13]。目前,这些信号因子在胎猪肾脏发育过程中的表达情况研究较少,明确各信号因子的表达情况有助于深入研究胎猪的肾脏发育,为构建肾缺失模型提供理论依据。本研究发现,相比于35 d的胎猪肾脏,75 d的胎猪肾脏中Pax2、Pax8、Six2、Six1、Sall1和Bmp4 mRNA及蛋白表达水平均有所增加,说明75 d是猪肾发生的关键时期。其中Pax2在35 d和75 d都有表达,且75 d表达含量更高,提示Pax2在胎猪肾脏发育中起着重要作用。对各时期Pax2表达的进一步研究发现,27.5 d即猪后肾发育起始时期,Pax2广泛表达在后肾间充质和输尿管芽中,并在后肾发育过程中持续表达于输尿管芽和肾单位发育的各个阶段。证明Pax2在猪后肾发育中至关重要,可能是胎猪肾脏发育的关键调控分子。

综上所述,本研究明确了不同时期胎猪肾脏的发育情况,同时也探究了肾脏发育相关信号分子的表达变化,为后续猪肾脏缺失模型的构建以及人源化肾脏的再生奠定了基础,同时也为异种器官移植、疾病模型的构建以及药物临床前安全性评价提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, et al. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells[J]. *Cell*, 2010, 142(5): 787-799
- [2] Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, et al. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(6): 2417-2426
- [3] Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, et al. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(12): 4557-4562
- [4] Chai OH, Song CH, Park SK, et al. Molecular regulation of kidney development[J]. *Anat Cell Biol*, 2013, 46(1): 19-31
- [5] Little MH, McMahon AP. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(5). doi: 10.1101/cshperspect.a008300
- [6] Ryan D, Sutherland MR, Flores TJ, et al. Development of the human fetal kidney from mid to late gestation in male and female infants[J]. *EBioMedicine*, 2018, 27: 275-283
- [7] Arrizabalaga JH, Nollert MU. Properties of porcine adipose-derived stem cells and their applications in preclinical models[J]. *Adipocyte*, 2017, 6(3): 217-223
- [8] Kaku Y, Taguchi A, Tanigawa S, et al. PAX2 is dispensable for in vitro nephron formation from human induced pluripotent stem cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4554
- [9] Brodbeck S, Englert C. Genetic determination of nephrogenesis: the Pax/Eya/Six gene network [J]. *Pediatr Nephrol*, 2004, 19(3): 249-255
- [10] Self M, Lagutin OV, Bowling B, et al. Six2 is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney[J]. *EMBO J*, 2006, 25(21): 5214-5228
- [11] Wang J, Liu M, Zhao L, et al. Disabling of nephrogenesis in porcine embryos via CRISPR/Cas9-mediated SIX1 and SIX4 gene targeting [J]. *Xenotransplantation*, 2019: e12484
- [12] Basta JM, Robbins L, Kiefer SM, et al. Sall1 balances self-renewal and differentiation of renal progenitor cells [J]. *Development*, 2014, 141(5): 1047-1058
- [13] Nishinakamura R, Sakaguchi M. BMP signaling and its modifiers in kidney development [J]. *Pediatr Nephrol*, 2014, 29(4): 681-686

[收稿日期] 2018-12-27