

L-精氨酸对肾脏组织形态和HSP70表达的影响

张 翠^{1,2}, 阮 征², 印遇龙^{1,2}, 邓泽元², 吴 信^{1,2,*}

(1.中国科学院亚热带农业生态研究所, 中国科学院亚热带农业生态过程重点实验室, 湖南 长沙 410125;

2.南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西 南昌 330031)

摘 要: 目的: 探讨L-精氨酸(L-Arg)对肾脏应激蛋白70(heat shock protein70, HSP70)表达量的影响, 以及L-Arg对肾功能的保护作用机制。方法: 以仔猪为模型, 按照性别、体质量以及血缘一致原则随机分成2组: 对照组、L-Arg组(基础日粮+0.6% L-Arg)。仔猪断奶后饲养7d, 于第8天取血浆和肾脏组织, 氨基酸分析仪测定血浆中的L-Arg、鸟氨酸(Orn)和瓜氨酸(Cit)。同时, 荧光实时定量PCR测定肾脏中HSP70和诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)mRNA表达水平, 免疫印记(Western blotting)方法测定HSP70和iNOS的蛋白表达量, 以及观察肾脏组织形态变化。结果: 日粮中添加L-Arg可显著提高仔猪血浆中L-Arg和Orn的含量, 同时减少肾小管中红细胞的数量和提高肾脏中iNOS和HSP70基因表达水平, 以及HSP70的蛋白表达量。结论: 在仔猪的日粮中添加L-Arg增加HSP70的蛋白和基因表达水平以及iNOS mRNA表达水平, 维持肾脏蛋白构象的稳定, 抑制应激引起的肾脏细胞凋亡途径的活化, 减轻肾小管形态学损伤, 避免断奶应激引起的肾脏损伤。

关键词: 精氨酸; 肾脏; 应激蛋白70; 仔猪

Effect of L-Arginine on Kidney Morphology and HSP70 Expression in Piglets

ZHANG Cui^{1,2}, RUAN Zheng², YIN Yu-long^{1,2}, DENG Ze-yuan², WU Xin^{1,2,*}

(1. Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, The Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China; 2. College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of L-arginine (L-Arg) on the expression of heat shock protein 70 mRNA and protein in kidney cells and its renal protective effect and mechanism. Methods: Twelve weaned piglets were randomly divided into two groups (6 piglets per group): one was control group and the other was L-Arg group, both of which were consistent with each other in terms of sex, body weight and consanguinity. A daily basal diet was fed to both groups and in addition, L-Arg was supplemented to the basal diet for the L-Arg group. After 7 d of feeding, all the piglets were killed, and plasma was collected for determination of the contents of L-Arg, ornithine (Orn) and citrulline (Cit) and kidney was also collected to determine the mRNA expression levels of HSP70 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) by PCR and the protein expression levels of HSP70 and iNOS by Western blotting and to observe morphological changes. Results: L-Arg supplementation significantly increased plasma levels of L-Arg and Orn, mRNA expression levels of HSP70 and iNOS and HSP70 protein expression level and reduced the number of erythrocytes in kidney tubules. Conclusion: L-Arg supplementation to the diet of piglets can elevate HSP70 protein and mRNA expression and iNOS mRNA expression in the kidney and protect the kidney through maintaining the conformational stability of proteins, inhibiting the activation of apoptotic pathways of cells and alleviating kidney damage induced by weaning stress.

Key words: L-Arg; kidney; HSP70; piglet

中图分类号: TS218; R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0271-04

精氨酸(L-arginine, L-Arg)是一种条件性必需氨基酸, 可在一氧化氮合成酶(NOS)的作用下生成一氧化氮(nitric oxide, NO), NO是一种内源性信使分子、血管内

皮舒张因子^[1]。L-Arg可通过L-Arg/NO途径, 增强II型糖尿病病人体内抗氧化能力, 抑制自由基的产生, 减少并发症的发生; 也可舒张血管, 抗血小板凝集, 减低血

收稿日期: 2011-09-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101730; 31110103909); 湖南省自然科学基金项目(11JJ4018);

食品科学与技术国家重点实验室开放基金项目(SKLF-KF-201005)

作者简介: 张翠(1986—), 女, 硕士, 研究方向为功能性氨基酸。E-mail: zh712ang@163.com

*通信作者: 吴信(1979—), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为功能性氨基酸。E-mail: wuxin@isa.ac.cn

压,对心脑血管疾病也有一定的药理作用^[2]。在临床可以治疗烧伤,肾脏充血引起的内脏感染和免疫功能紊乱^[3-4]。因此,*L*-Arg在体内可作为治疗肥胖、糖尿病和代谢综合的新型药物。*L*-Arg可提高断奶大鼠的生长性能^[5],对肾脏功能紊乱提供良好的预防作用。Klahr等^[6]研究表明*L*-Arg可保护肾小管功能,降低各种肾小管损伤的酶的分泌,减轻肾小管形态学损伤。NO作为一种重要的血管活性物质,其含量的改变与肾小球的滤过、肾血流动力学水平和肾机能的紊乱密切相关^[7]。Baylis^[8]研究表明肾脏中NO含量降低、抑制一氧化氮合成酶活性或精氨酸缺乏引起NO合成不足,均会影响肾脏功能,甚至发生病变。

仔猪断奶阶段易受到营养、环境和代谢等应激因素的影响,肾脏呈现轻度或重度局灶性、间质性肾炎,肾小管的间质内有结缔组织增生。热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一类具有维持机体自身稳定的多功能应激蛋白,多种刺激均可诱导其表达,尤其在应激细胞中表达被高度诱导。在应激状态下,HSP对肾脏起着重要保护作用。在肾脏缺血再灌注中HSP27、HSP70、HSP90等多种HSPs表达提高数倍,可避免肾脏损伤和加快肾脏功能修复^[9]。食物中添加*L*-Arg可促进断奶仔猪肠道黏膜HSP70表达,在肾脏功能衰竭的动物模型中的研究结果表明*L*-Arg可通过释放NO缓解肾脏功能衰竭的症状^[10]。本实验旨在研究日粮中添加*L*-Arg对仔猪断奶应激期肾脏形态和HSP70表达的影响,探讨*L*-Arg对肾脏保护机制,为*L*-Arg在人类和动物的营养保健中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物饲养与试剂

选取杜长大三元仔猪12头,于21日龄断奶后按照性别、体质量以及血缘一致原则随机分成2组,每组6头。各实验组分别饲喂基础日粮(SD)和SD+*L*-Arg(质量分数0.6%),实验期为7d。基础日粮配方为:玉米(499g/kg)、豆粕(242g/kg)、鱼粉(60g/kg)、乳清粉(90g/kg)和乳脂粉(粗脂肪50%,60g/kg)为主要成分。本实验参照美国国家研究委员会(National Research Council, NCR)1998营养需要推荐及饲养标准配制基础日粮,日粮的平衡考虑消化能(14.2MJ/kg)、粗蛋白(200g/kg)以及主要限制性氨基酸(赖氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸、苏氨酸及色氨酸)的表观回肠末端消化率及钙和磷的含量。

精氨酸 日本Ajinomoto公司;肝素钠 上海宝曼生物科技有限公司;TRIzol、焦磷酸二乙酯 美国Invitrogen公司;DNA消化酶I(RNase Free,1000U)、反转录试剂盒 加拿大MBI Fermentas公司;DRR041A SYBR Premix *Ex Taq* 日本TaKaRa公司;兔抗人多克隆抗体 加拿大Stressgen Bioreagents公司;羊抗兔二抗

武汉博士德公司;ECL化学发光试剂 美国Pierce公司。

1.2 仪器与设备

L28800型全自动氨基酸分析仪 日本日立公司;YS100光学显微镜 日本Nikon公司;石蜡切片机 德国莱卡公司;JG328型分析天平 上海第三分析仪器厂;5415D/R超速离心机、533105588梯度PCR仪 德国Eppendorf公司;NanoDrop ND-1000分光光度计 美国NanoDrop Technologies公司;DYY-6B电泳仪 北京市六一仪器厂;GDS-8000凝胶成像系统 美国UVP Bioluminescence Imaging System公司;ABI7900HT实时定量PCR仪 美国ABI公司;Mini3垂直电泳槽和垂直电转槽 美国Bio-Rad公司。

1.3 动物管理与样品采集

于实验第8天空腹12h后颈静脉采血10mL,肝素钠抗凝,静置20min后3000r/min离心15min后分离血浆,然后心脏放血致死,迅速剖开腹腔,取肾脏样品置于液氮中,进行荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)、蛋白印迹检测,然后取肾脏组织在中性福尔马林溶液保存,用于免疫组化和组织病理学观察。

1.4 分析与测定

1.4.1 血浆中氨基酸浓度的测定

氨基酸分析仪过茚三酮柱后衍生法测定血清中*L*-Arg、Orn和Cit的浓度。

1.4.2 HE染色测定肾脏

肾组织经石蜡包埋、切片,苏木精-伊红染色法(HE)染色,切片制作完成后,在光学显微镜观察肾小管和肾小球毛囊中的红细胞数目。

1.4.3 RT-PCR测定肾脏组织中HSP70 mRNA表达水平

RT-PCR分析肾脏组织HSP70的表达水平:用Trizol方法从肾脏组织中提取总RNA,同时根据试剂盒按照说明书,使用Fermentas反转录试剂盒翻转mRNA为cDNA。引物序列如表1所示。

表1 仔猪GAPDH、HSP70和iNOS mRNA上游和下游引物序列
Table 1 The upstream and downstream primer sequences of GAPDH, iNOS and HSP70 in piglets

项	上游序列	下游序列
HSP70	5'-GCGAAGTTGTGTTGGTTG-3'	5'-GCGAAGTTGTGTTGGTTG-3'
iNOS	5'-CCCTTCGGAAGTTCTGGCAGCAGG-3'	5'-GGCTGTCAGAGCCTTGT-3'
GAPDH	5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'

荧光定量采用二步法,分别为PCR反应条件:酶激活95℃ 30s;循环(95℃ 5s,60℃ 30s),共进行40个循环。采用2- $\Delta\Delta C_t$ 法^[11],以GAPDH为内参测定mRNA相对表达量。

1.4.4 免疫印迹分析肾脏中HSP70蛋白表达水平

取约100μg肾脏样品提取蛋白,用Bicinchoninic acid蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度,每个肾脏样品取10μg总蛋白,4%~10% SDS-PAGE凝胶电泳,80V电泳至溴酚

蓝达分离胶, 加大电压至100V, 直至溴酚蓝达凝胶的底部, 半干电转移至硝酸纤维膜上, 5%脱脂奶粉封闭。加入1:1000稀释的兔抗人多克隆抗体, 37℃温育2h, 加入1:3000辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗, 室温振荡孵育2h, PBS洗膜, ECL化学发光试剂显像检测。以 β -actin蛋白做为内参。

1.5 数据处理及统计分析

用SPSS13.0统计软件进行单因素方差分析和DUNCAN式多重比较, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 L-Arg对仔猪血浆中氨基酸浓度的作用

表2 L-Arg对仔猪血浆Arg、Orn和Cit浓度的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Effect of L-Arg on plasma Arg, Orn and Cit levels in piglets ($\bar{x} \pm s, n=6$)

氨基酸	对照组	L-Arg组
L-Arg含量/(nmol/mL)	283.00 \pm 20.24	319.81 \pm 73.29*
Orn含量/(nmol/mL)	206.50 \pm 21.90	222.40 \pm 16.84*
Cit含量/(nmol/mL)	61.63 \pm 22.74	86.11 \pm 29.58

注: *. 与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)。下同。

如表2所示, 血浆氨基酸水平结果实验组较对照组的L-Arg和Orn均有显著升高($P < 0.05$), Cit组和对照组相比没有显著差异($P > 0.05$)。因此日粮中添加L-Arg可使仔猪血浆中L-Arg和Orn的含量显著升高。

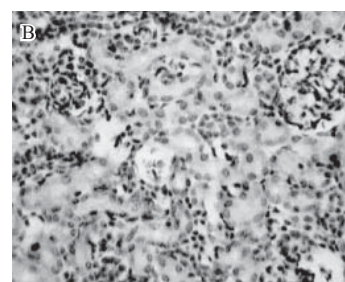
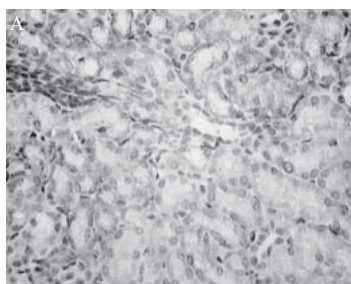
2.2 L-Arg对仔猪肾脏质量的影响

表3 日粮中添加L-Arg对仔猪肾脏质量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Effect of L-Arg on kidney weight in piglets ($\bar{x} \pm s, n=6$)

项	对照组	L-Arg组
肾脏质量/g	15.08 \pm 1.83	17.83 \pm 3.33

如表3所示, 与对照组相比, 仔猪日粮中添加L-Arg对肾脏质量没有显著影响($P > 0.05$), 但添加L-Arg可使仔猪肾脏质量升高12.2%, 日粮添加L-Arg有使肾脏质量增加的趋势。

2.3 L-Arg对仔猪肾脏形态学的影响



A. 对照组; B. L-Arg组。

图1 L-Arg对仔猪肾脏形态学的影响

Fig. 1 Effect of L-Arg on kidney morphology in piglets

由图1可知, 与对照组相比, 日粮中添加L-Arg仔猪的肾脏肾小管结构轮廓较为明显, 上皮细胞结构较为饱满, 无溶核现象发生; 肾小球囊内红细胞数目减少。

2.4 L-Arg对仔猪肾脏HSP70和iNOS mRNA表达的影响

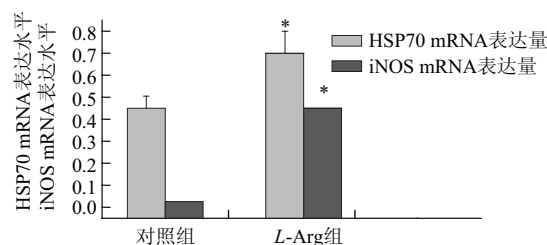


图2 L-Arg对仔猪肾脏中HSP70和iNOS mRNA表达量的影响($n=6$)

Fig. 2 Effect of L-Arg on mRNA expression of HSP70 and iNOS in the kidney of piglets ($n=6$)

由图2可知, 仔猪日粮中添加L-Arg可显著提高肾脏中HSP70和iNOS mRNA的表达量($P < 0.05$)。因此, 日粮添加L-Arg可显著提高仔猪HSP70和iNOS mRNA在肾脏中表达量。

2.5 L-Arg对仔猪肾脏HSP70蛋白表达量的影响

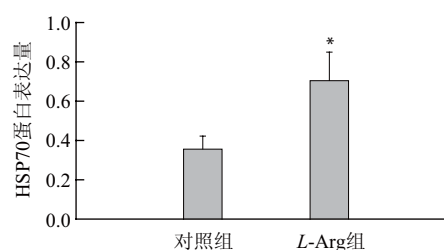


图3 L-Arg对仔猪肾脏中HSP70蛋白表达水平的影响($n=6$)

Fig. 3 Effect of L-Arg on HSP70 protein expression in the kidney of piglets($n=6$)

由图3可知, 与对照组相比, 添加L-Arg的仔猪肾脏中HSP70蛋白表达量显著升高($P < 0.05$), 因此精氨酸可提高肾脏中HSP70蛋白量的表达。

3 讨论

肾脏可过滤血液中有毒的代谢物, 是人体重要的器官。幼年时期肾脏容易受到环境和基因的影响, 造成慢

性肾脏疾病、急性肾脏损伤等疾病^[12],大量研究表明添加L-Arg可以通过L-Arg/NO途径治疗和缓解这些症状。而仔猪的断奶时期,肾脏易发生多系统衰竭综合症,肾小管的间质内结缔组织增生,易引起组织水肿;肾小囊内出现蛋白性滤出物,可使肾囊压增高,滤出减少,排尿量少,增加腹泻,影响仔猪的正常生长^[13]。在食物中添加L-Arg,增强肾脏血液流动的速度和肾小球滤过滤,以及白蛋白和环鸟苷酸排泄量,缓解断奶应激对肾脏造成的功能紊乱。亦大量研究证实L-Arg具有维持肾脏功能稳定和治疗肾脏疾病的作用^[6]。

实验结果表明仔猪日粮中添加L-Arg显著提高血清中的L-Arg和Orn,对Cit浓度没有显著影响。Orn、Cit等属于精氨酸家族氨基酸,在大多数哺乳动物的肠道、肝脏和肾脏内通过复杂的代谢可互相转化^[14],维持体内各种氨基酸含量的平衡。肾脏质量是衡量肾脏健康状况的一个重要指标,本实验结果表明日粮中L-Arg添加可使仔猪肾脏质量具有增加的趋势。

Chander等^[10]研究表明患有急性肾脏衰竭的小鼠肾脏中红细胞释放进入血液循环而血红细胞中包含吸附NO的血红素成分,导致NO氧化生成氮,NO含量降低,降低血流量,加剧肾脏损伤,L-Arg或NO释放因子可缓解这一症状。肾脏组织HE染色的形态学结果表明,仔猪日粮中添加L-Arg改善肾小管结构和降低血红细胞数目,避免血红细胞释放的血红蛋白对肾脏血管的危害,同时外源性L-Arg亦可降低与肾小管损伤相关酶的分泌,减轻肾小管形态学损伤^[15],对仔猪的肾脏具有保护作用。

在仔猪的食物中添加L-Arg,可提高iNOS活性,加速NO合成。NO在体内可调节入球动脉、系膜细胞、球后直小血管的功能^[16]。生物体中富含低分子质量硫醇谷胱甘肽,NO在氧化还原形成S-亚硝基硫醇和二硫物的过程中,刺激肾脏中HSP70的表达,抑制应激和细胞凋亡途径的活化^[17]。而HSP70是经典的HSP成员,是一类具有维持机体自身稳定功能的应激蛋白,多种刺激均可诱导其表达^[18],在细胞应激状态下具有维持蛋白质的正确构象、避免RNA及DNA合成过程中遭受损伤等多种生物学功能。Bidmon等^[19]研究表明肾脏局部缺血时,HSP70可修复远端肾小管的结构和抑制肾脏细胞死亡途径的活化,维持肾脏功能的稳定。本实验结果表明仔猪日粮中添加L-Arg提高肾脏中iNOS mRNA表达量;肾脏中HSP70在mRNA和蛋白表达水平都有显著升高。因此,在仔猪的日粮中添加L-Arg可显著增加肾脏iNOS mRNA的表达,提高肾脏血管中NO浓度,促进肾脏中HSP70 mRNA和蛋白水平上得表达,这与刘燕等^[20]研究结果相一致。而Manucha等^[21]研究表明HSP70可抑制肾脏细胞凋亡途径的活化,维持肾脏中蛋白质的正确构象,避免肾脏损伤。同时,Baylis^[22]研究表明在慢性肾脏疾病中较低的NO含量会诱导血管红细胞的释放、血管变性和血压升高等并发症。因此,添加L-Arg、iNOS的mRNA表达量升高,促进肾脏NO的生成,维持肾脏血管形态的正常以及诱导肾小管内皮细胞中HSP70的表达^[23],维持肾脏中蛋白的正确构象和抑制细胞凋亡的发生,保证仔猪应激期肾脏形态和功能的正常,这与本实验中肾脏形态学的结果相吻合。

因此,在日粮中添加L-Arg,提高了血清L-Arg、Cit含量,增加了肾脏中NO含量;同时形态学结果表明肾小管结构的稳定和肾小球囊中血红细胞的数量减少,提高仔猪肾脏中iNOS mRNA表达水平,促进HSP70蛋白质,抑制细胞凋亡,有利于应激期肾脏生长和功能的维持。

参考文献:

- [1] WU G Y, BAZER F W, DAVIS T A, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease[J]. *Amino Acids*, 2009, 37: 153-168.
- [2] 单永红, 刘炳成. 精氨酸: 一种多功能的生化药物[J]. *中国生化药物杂志*, 2001, 22(5): 265-267.
- [3] DROVER J W, DHALIWAL R, WEITZEL L, et al. perioperative use of arginine-supplemented diets: a systematic review of the evidence[J]. *J Am Coll Surg*, 2011, 212(3): 385-399.
- [4] BARBUL A, LAZAROU S A, EFRON D T, et al. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans[J]. *Surgery*, 1990, 108(2): 331-336.
- [5] 黄新球, 王远兴, 杨有仙, 等. 日粮中添加N-氨甲酰-L-谷氨酸及精氨酸对断奶小鼠生长性能的影响[J]. *食品科学*, 2011, 32(19): 253-257.
- [6] KLAHR S, MORRISSEY J. L-arginine as a therapeutic tool in kidney disease[J]. *Nephrology*, 2004, 24(4): 389-394.
- [7] SCHWARTZ I F, SCHWARTZ D, TRASKONOV M. L-Arginine transport is augmented through up regulation of tubular CATO2 mRNA in ischemic acute renal failure in rats[J]. *Kidney Int*, 2002, 62(5): 1700-1706.
- [8] BAYLIS C. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease[J]. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006, 2(4): 209-220.
- [9] ZHANG P L, LUN M Y, SCHWORER C, et al. Heat shock protein expression is highly sensitive to ischemia-reperfusion injury in rat kidneys[J]. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2008, 38(1): 57-64.
- [10] CHANDER V, CHOPRA K. Molsidomine, a nitric oxide donor and L-arginine protects against rhabdomyolysis-induced myoglobinuric acute renal failure[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1723: 208-214.
- [11] LIVAK K, SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta Ct$ method[J]. *Method*, 2001, 25(4): 402-408.
- [12] MENCARELLI F, KIEPE D, LEOZAPPA G, et al. Growth hormone treatment started in the first year of life in infants with chronic renal failure[J]. *Pediatr Nephrol*, 2009, 24: 1039-1046.
- [13] 董发明, 王天奇, 邱妍, 等. 断奶仔猪多系统衰竭综合征猪肺脏、肝脏、肾脏等器官病理组织学研究[J]. *兽医临床*, 2008(8): 64-65.
- [14] WU G Y, BAZER F, DAVIS T, et al. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production[J]. *Livestock Science*, 2007, 112: 8-22.
- [15] HEIDBREDE E, KLEINERT D, LOPAU K. Influence of the NO/L-arginine-system on tacrolimus-induced changes of renal hemodynamics[J]. *American Journal of Hypertension*, 2001, 14(4): 63-68.
- [16] WANGENSTEEN R, QUESADA A, SAINZ J, et al. Role of endothelium-derived relaxing factors in adrenomedullin-induced vasodilation in the rat kidney[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2002, 444(2): 97-102.
- [17] EFREMOVA S, MARGULIS B, GUZHOVA I, et al. Heat shock protein Hsp70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper Plant[J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 57(4): 267-280.
- [18] SCHMITT E, GEHRMANN M, BRUNET M, et al. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 81: 15-27.
- [19] BIDMON B, ENDEMANN M, MÜLLER T, et al. Heat shock protein-70 repairs proximal tubule structure after renal ischemia[J]. *Kidney International*, 2000, 58: 2400-2407.
- [20] 刘燕, 夏晓红, 苗智慧, 等. L-精氨酸对大鼠肾缺血再灌注损伤HSP70表达的影响[J]. *长治医学院学报*, 2011, 25(3): 161-163.
- [21] MANUCHA W, VALLES P G. Cytoprotective role of nitric oxide associated with Hsp70 expression in neonatal obstructive nephropathy[J]. *Nitric Oxide*, 2008, 18: 204-215.
- [22] BAYLIS C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294: 1-9.
- [23] PAOLO C, ROBERTO B, ANTONELLA T, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate modulates HSP70, iNOS, and apoptosis during hemorrhagic shock resuscitation in rats[J]. *Journal of Investigative Surgery*, 2010, 23: 295-302.