

## 双环醇对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质 PAI-1 表达的影响

刘艳红 韩子明

(新乡医学院第一附属医院儿内二科,河南 卫辉 453100)

**[摘要]** 目的 探讨双环醇延缓肾间质纤维化的可能机制。方法 将 81 只 Sprague-Dawley (SD)大鼠随机分为假手术组,模型组和治疗组 3 组。采用单侧输尿管梗阻(UUO)致肾间质纤维化大鼠模型,治疗组在制模后给予双环醇灌胃治疗。7、14、21 d 取梗阻侧肾组织行苏木精-伊红及 Masson 染色,观察肾脏病理学变化。免疫组化法检测肾组织纤溶酶原激活物抑制-1 (PAI-1) 的表达。RT-PCR 法检测肾组织 PAI-1 mRNA 的表达水平。**结果** 治疗组 7 d、14 d、21 d 肾间质纤维化的相对面积分别为 (9.6±0.6)%、(16.8±0.8)%、(33.6±1.6)%,较模型组[分别为(13.0±0.7)%、(25.8±1.5)%、(53.2±2.5)%]明显降低(均  $P < 0.05$ );同时治疗组肾组织 PAI-1 蛋白表达及 PAI-1 mRNA 的表达均较模型组减少(均  $P < 0.05$ )。**结论** 双环醇能够减轻 UUO 所致的肾间质损伤及纤维化程度,其作用机制可能是通过下调 PAI-1 的表达从而延缓肾间质纤维化的进程,发挥对肾脏的保护作用。  
[中国当代儿科杂志,2011,13(6):509-513]

**[关键词]** 肾间质纤维化;单侧输尿管梗阻;双环醇;纤溶酶原激活物抑制剂-1;大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)06-0509-05

### Effects of bicyclol on renal PAI-1 expression in rats with unilateral ureteral obstruction

LIU Yan-Hong, HAN Zi-Ming. Department of Internal Medicine, Xinxiang Medical College, Weihui, Henan 453100, China (Han Z-M, Email: hanziming1964@126.com)

**Abstract: Objective** To explore the protective effects of bicyclol against renal interstitial fibrosis and possible mechanisms of the protection. **Methods** Eighty-one Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to a sham-operated group and UUO groups with and without bicyclol treatment. A rat model of renal interstitial fibrosis was prepared by unilateral ureteral obstruction (UUO). Renal tissues were examined by hematoxylin & eosin and Masson staining on 7, 14 and 21 days. Immunohistochemistry was used for determining plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in the renal interstitium. PAI-1 mRNA expression in renal tissues was semi-quantitatively determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The relative areas of renal interstitial fibrosis in the bicyclol-treated UUO group 7, 14 and 21 days after operation were (9.6±0.6)%, (16.8±0.8)% and (33.6±1.6)% respectively, which were significantly lower than those in the untreated UUO group [(13.0±0.7)%, (25.8±1.5)% and (53.2±2.5)% respectively] ( $P < 0.05$ ). The levels of protein and mRNA expression of PAI-1 in the bicyclol-treated UUO group decreased significantly compared with those in the untreated UUO group 7, 14 and 21 days after operation ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Bicyclol can alleviate renal interstitial injury and renal interstitial fibrosis caused by UUO in rats, possibly through a down-regulation of renal PAI-1 expression. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (6):509-513]

**Key words:** Renal interstitial fibrosis; Unilateral ureteral obstruction; Bicyclol; Plasminogen activator inhibitor-1; Rats

肾间质纤维化是反映肾功能下降严重程度和判断预后最重要的指标<sup>[1]</sup>,它几乎是所有肾脏疾病发展到终末期肾衰竭的共同通路。因而阻止或延缓肾间质纤维化对慢性肾脏疾病的治疗具有重要意义。双环醇是一种抗肝炎新药。研究发现,双环醇不仅能抑制病毒的复制,降低多种肝损伤后转氨酶升高

的水平,而且对不同类型的肝纤维化具有明显的抑制作用<sup>[2-3]</sup>,肾脏纤维化的机制同肝纤维化的机制基本相同,双环醇在肝纤维化中起保护作用,但对单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)大鼠肾脏是否具有保护作用以及其机制如何国内外鲜有报道。为此,本研究通过双环醇干预肾间质纤维化

[收稿日期]2010-08-17;[修回日期]2010-10-19

[作者简介]刘艳红,女,硕士,主治医师。

[通信作者]韩子明,教授。

模型大鼠,观察 UUO 术后肾组织纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)蛋白及 PAI-1 mRNA 的表达水平,探讨双环醇对 UUO 大鼠肾间质纤维化的影响及其可能作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

双环醇购自北京协和药厂,兔抗大鼠 PAI-1 多克隆抗体以及 SABC 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;M-MLV 逆转录酶、dNTP、Rnasin、随机引物购自上海生物工程公司;Tab DNA 聚合酶由美国 Promega 公司提供;大鼠 PAI-1 mRNA 引物由上海生物工程公司合成。PAI-1 引物序列:正义 5' CATCAACGACTGGGTGGAGAG3',反义 5' ACTTAGGCAGGATGAGGAGGC3',产物长度 428 bp; $\beta$ -actin 引物序列:正义 5' CTTTTGTGCCTTGATAGTTC3',反义 5' GAGTCCTTCTGACCCATAC3',产物长度 265 bp。

### 1.2 实验动物

健康 13 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 81 只,由新乡医学院实验动物中心提供,体重 200 ~ 250 g,生长活动良好,进食正常。

### 1.3 动物分组及 UUO 模型建立

将实验大鼠随机均分为假手术组、模型组和治疗组,每组 27 只。模型制作参照文献进行<sup>[4]</sup>:无菌条件下行左侧输尿管结扎并剪断。假手术组只游离输尿管而不结扎。治疗组于术后即开始给予双环醇每日 200 mg/kg 灌胃;假手术组和模型组给予等量生理盐水灌胃。分别于术后第 7、14、21 天每组随机处死 9 只大鼠,留取梗阻侧肾脏标本,一半置于 10% 福尔马林溶液中固定制作 3  $\mu$ m 石蜡切片,用于苏木精-伊红(HE)、Masson 和免疫组化染色;一半装入 DEPC 处理过的冻存管中,保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱,用于提取总 RNA。

### 1.4 肾脏组织病理

行 HE、Masson 染色后在 IDA-2000 高清晰度数码图像分析系统下计算肾小管间质纤维化相对面积:每张切片随机选取 10 个不重叠视野,测定小管间质纤维化面积与同视野小管间质总面积的百分比,取其平均值作为每张切片的肾间质纤维化相对面积。肾间质损伤进行半定量评分,取其平均积分为每张切片评分。评分标准参见文献<sup>[5]</sup>。0 分:无病变;1 分: < 25%;2 分: 26% ~ 50%;3 分: > 50%。

### 1.5 免疫组化检测 PAI 蛋白表达

用免疫组化 SABC 法检测肾组织中 PAI-1 的表达,操作步骤按 SABC 试剂盒说明书进行。光镜下胞浆内棕黄色颗粒性沉积为阳性细胞。高倍镜(400 $\times$ )下在每张不包含肾小球和血管的肾小管间质区域随机选取 10 个不重叠的视野,应用 IDA-2000 高清晰度数码图像分析系统进行图像采集,经灰度变换将阳性染色区域面积与该视野总面积百分比,计算平均值作为该样本的百分比值<sup>[6]</sup>。

### 1.6 RT-PCR 检测 PAI-1 mRNA 表达

PAI-1 mRNA 的表达检测按 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明书。抽提大鼠肾组织总 RNA,逆转录扩增 cDNA。根据 Genbank 提供的上下游引物,以 cDNA 为模板,PCR 扩增 PAI-1 mRNA,PCR 的反应条件如下:94 $^{\circ}$ C, 2 min 变性;(94 $^{\circ}$ C, 30 s; 56.6 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 50 s)  $\times$  30 个循环;72 $^{\circ}$ C, 10 min 延伸。反应产物行琼脂糖凝胶电泳,并在紫外光下采集图像进行分析。PAI-1 与  $\beta$ -actin 扩增条带的吸光面积积分比值作为各指标 mRNA 相对表达水平。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异采用单因素方差分析。PAI-1 和 PAI-1 mRNA 的表达和肾间质损伤、肾间质相对面积之间的相关性判断采用 pearson 法相关分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠肾脏组织学改变

HE 及 Masson 染色显示模型组术后第 7 天肾间质可见炎性细胞浸润,肾小管上皮细胞胞浆疏松、肿胀和空泡变性,部分肾小管扩张,间质水肿、增宽,细胞及细胞外基质成分增多,皮质区和皮髓交界区出现纤维化;第 14 天可见肾间质炎性细胞浸润明显,肾小管明显扩张,部分小管上皮细胞脱落、萎缩,间质增宽明显,皮质区和皮髓交界区纤维化明显;第 21 天可见炎症细胞弥漫浸润,肾小管结构遭到严重破坏,肾小管扩张变形及广泛萎缩,小管间质明显增宽,可见大量增生的纤维组织。假手术组大鼠肾组织未见上述改变。治疗组各时间点与模型组相比,肾间质炎性细胞浸润减轻,肾小管扩张、萎缩明显改善,肾间质纤维化面积减少,肾间质损伤指数均降低( $P < 0.05$ ),但仍高于假手术组( $P < 0.01$ )。肾小管间质损伤评分见表 1 及图 1,肾间质纤维化相对面积见表 2 及图 2。

**表 1 各组大鼠肾小管间质损伤评分** ( $\bar{x} \pm s$ )

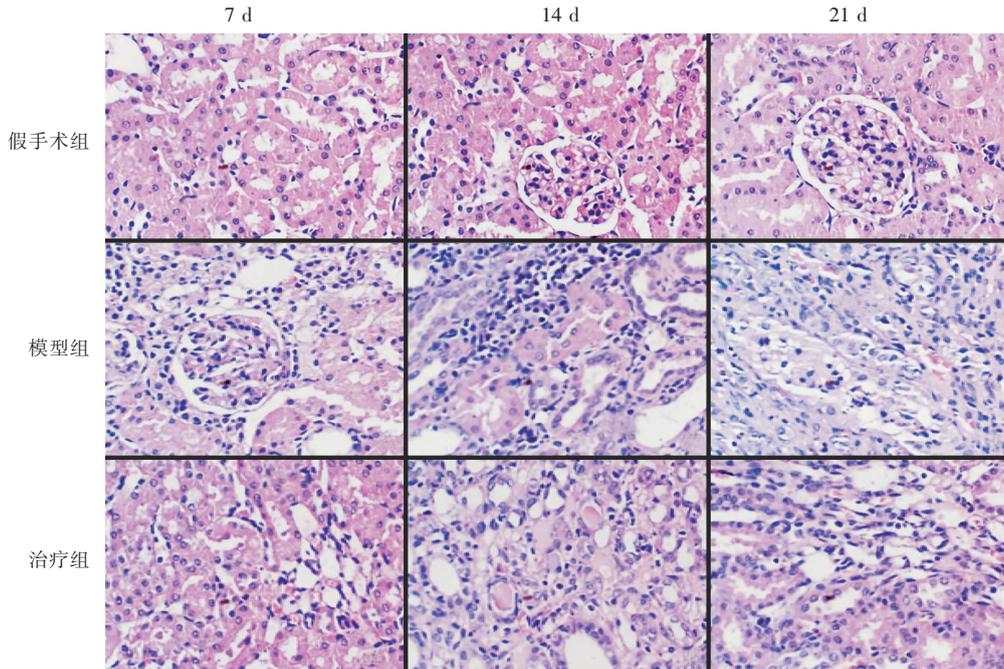
| 组别   | 鼠数 | 7 d                        | 14 d                         | 21 d                         | F 值   | P 值   |
|------|----|----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------|-------|
| 假手术组 | 27 | 0.51 ± 0.07                | 0.53 ± 0.09                  | 0.54 ± 0.07                  | 0.08  | >0.05 |
| 模型组  | 27 | 3.39 ± 0.20 <sup>a</sup>   | 5.02 ± 0.25 <sup>a,c</sup>   | 6.13 ± 0.36 <sup>a,c</sup>   | 22.02 | <0.05 |
| 治疗组  | 27 | 2.24 ± 0.24 <sup>a,b</sup> | 3.85 ± 0.26 <sup>a,b,c</sup> | 5.22 ± 0.36 <sup>a,b,c</sup> | 26.27 | <0.05 |
| F 值  |    | 50.06                      | 115.39                       | 101.75                       |       |       |
| P 值  |    | <0.01                      | <0.01                        | <0.01                        |       |       |

a: 与假手术组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与同组前一时间点比较,  $P < 0.05$

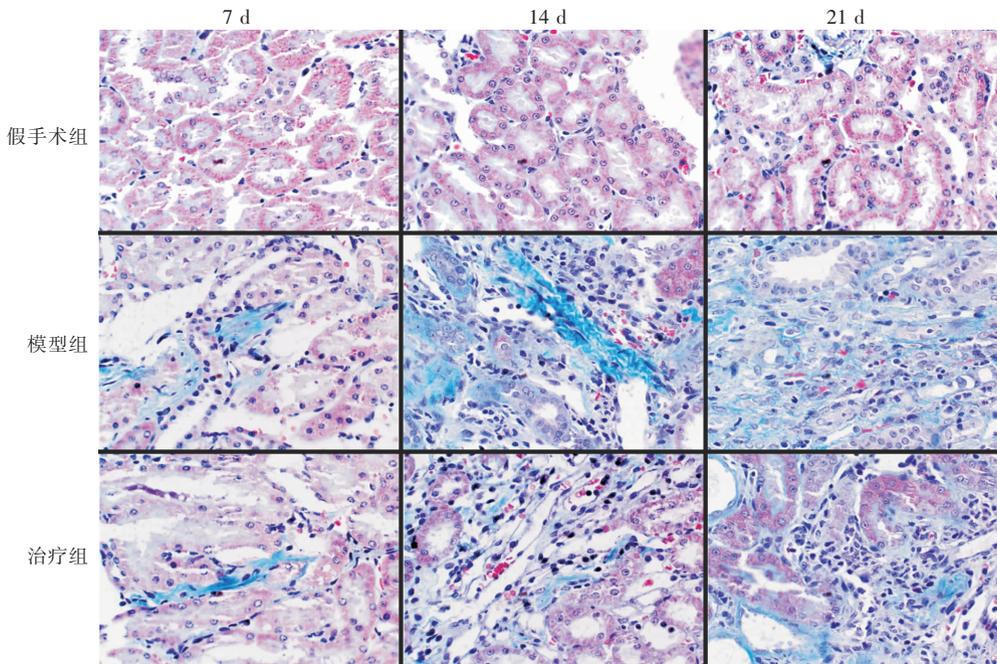
**表 2 各组大鼠肾间质纤维化相对面积比较** ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别   | 鼠数 | 7 d                      | 14 d                        | 21 d                        | F 值    | P 值   |
|------|----|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------|-------|
| 假手术组 | 27 | 1.8 ± 0.1                | 1.8 ± 0.2                   | 2.0 ± 0.2                   | 0.36   | >0.05 |
| 模型组  | 27 | 13.0 ± 0.7 <sup>a</sup>  | 25.8 ± 1.5 <sup>a,c</sup>   | 53.2 ± 2.5 <sup>a,c</sup>   | 146.25 | <0.05 |
| 治疗组  | 27 | 9.6 ± 0.6 <sup>a,b</sup> | 16.8 ± 0.8 <sup>a,b,c</sup> | 33.6 ± 1.6 <sup>a,b,c</sup> | 770.95 | <0.05 |
| F 值  |    | 125.02                   | 151.68                      | 230.67                      |        |       |
| P 值  |    | <0.01                    | <0.01                       | <0.01                       |        |       |

a: 与假手术组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与同组前一时间点比较,  $P < 0.05$



**图 1 各组肾小管间质损伤 (HE, ×400)** 治疗组各时间点与模型组相比, 肾间质炎性细胞浸润减轻, 肾小管扩张、萎缩明显改善。随着梗阻时间延长, 模型组及治疗组肾间质炎性细胞浸润增多, 肾小管扩张、萎缩逐渐加重。



**图 2 各组大鼠肾间质纤维化 (Masson, ×400)** 随着梗阻时间延长, 模型组及治疗组肾间质纤维化逐渐加重。治疗组各时间点与模型组相比, 肾间质纤维化面积减少。

### 2.2 各组大鼠肾间质 PAI-1 的表达

假手术组大鼠各时间点 PAI-1 极微量表达于肾小管上皮细胞胞浆内。模型组 PAI-1 在大鼠肾小管上皮细胞及间质细胞胞浆大量表达,且表达量随梗阻时间延长而明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比,治疗组表达部位基本一致,但区域缩小、强度减弱。模型组和治疗组各时间点 PAI-1 表达量较假手术组明显增加(均  $P < 0.01$ ),但治疗组与模型组相比,表达下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 3 及图 3。

表 3 各组大鼠不同时间点 PAI-1 相对表达面积比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别   | 鼠数 | 7 d                        | 14 d                         | 21 d                          | F 值    | P 值   |
|------|----|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------|-------|
| 假手术组 | 27 | 0.43 ± 0.12                | 0.47 ± 0.15                  | 0.53 ± 0.16                   | 1.57   | >0.05 |
| 模型组  | 27 | 7.29 ± 0.27 <sup>a</sup>   | 12.32 ± 0.59 <sup>a,c</sup>  | 18.36 ± 0.71 <sup>a,c</sup>   | 707.31 | <0.05 |
| 治疗组  | 27 | 4.26 ± 0.27 <sup>a,b</sup> | 7.69 ± 0.39 <sup>a,b,c</sup> | 13.35 ± 0.39 <sup>a,b,c</sup> | 348.08 | <0.05 |
| F 值  |    | 469.85                     | 320.62                       | 376.10                        |        |       |
| P 值  |    | <0.01                      | <0.01                        | <0.01                         |        |       |

a: 与假手术组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与同组前一时间点比较,  $P < 0.05$

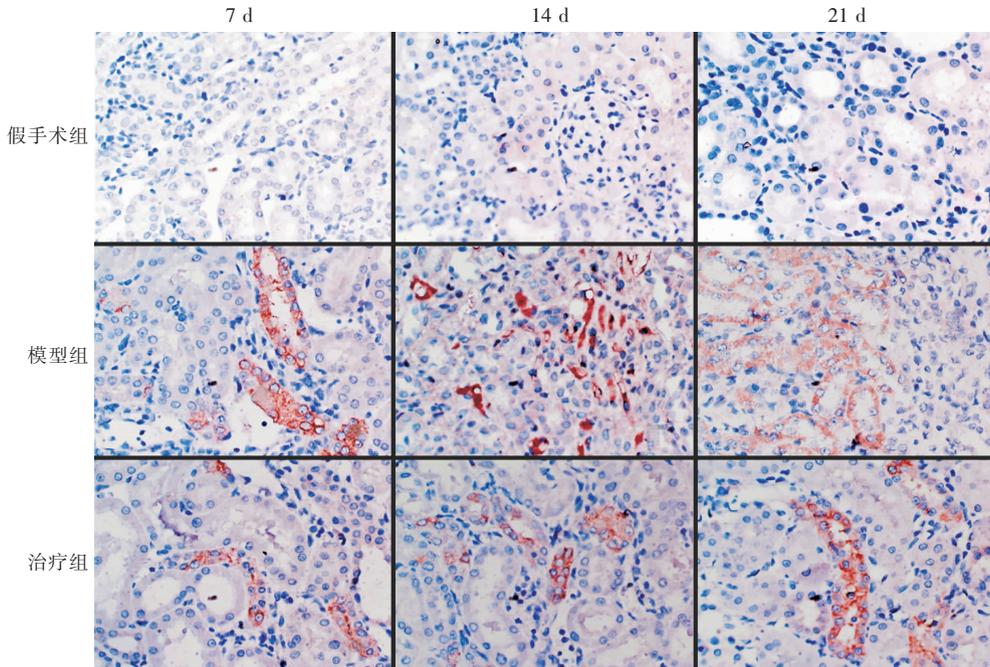


图 3 双环醇对 PAI-1 表达的影响(免疫组化, ×400) 随着梗阻时间延长,模型组及治疗组 PAI-1 表达量逐渐增加。治疗组各时间点与模型组相比,PAI-1 表达量减少。表达 PAI-1 的阳性细胞,细胞胞浆有大量棕黄色颗粒表达。

### 2.3 各组大鼠肾组织 PAI-1 mRNA 表达

假手术组大鼠肾脏有少量 PAI-1 mRNA 表达。模型组及治疗组大鼠 PAI-1 mRNA 的表达均较假手术组明显增高;且随着梗阻时间的延长,PAI-1 mRNA 的表达逐渐增强,而治疗组各时间点 PAI-1 mRNA 的表达明显低于模型组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 4 及图 4。

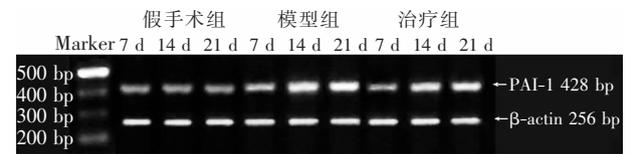


图 4 双环醇对 PAI-1 mRNA 水平的影响(RT-PCR)

表 4 三组大鼠不同时间点 PAI-1 mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 鼠数 | 7 d                        | 14 d                         | 21 d                         | F 值    | P 值   |
|------|----|----------------------------|------------------------------|------------------------------|--------|-------|
| 假手术组 | 27 | 0.08 ± 0.02                | 0.11 ± 0.02                  | 0.16 ± 0.02                  | 8.01   | >0.05 |
| 模型组  | 27 | 1.17 ± 0.11 <sup>a</sup>   | 2.29 ± 0.12 <sup>a,c</sup>   | 3.33 ± 0.26 <sup>a,c</sup>   | 138.66 | <0.05 |
| 治疗组  | 27 | 0.32 ± 0.03 <sup>a,b</sup> | 1.18 ± 0.05 <sup>a,b,c</sup> | 2.06 ± 0.12 <sup>a,b,c</sup> | 215.47 | <0.05 |
| F 值  |    | 91.54                      | 459.51                       | 539.05                       |        |       |
| P 值  |    | <0.01                      | <0.01                        | <0.01                        |        |       |

a: 与假手术组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与同组前一时间点比较,  $P < 0.05$

## 2.4 相关分析结果

Spearman 相关分析显示, PAI-1 阳性染色面积与肾小管间质损伤、肾间质纤维化相对面积呈显著正相关, 相关系数分别为 0.929、0.957 ( $P < 0.01$ ); PAI-1 mRNA 表达量与肾小管间质损伤、肾间质纤维化相对面积呈显著正相关, 相关系数分别为 0.906、0.940, 均  $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

肾间质纤维化是各种不同病因的慢性肾脏疾病发展到终末期肾功能衰竭的共同途径和最终结果<sup>[7]</sup>, 其本质是细胞外基质 (ECM) 的异常沉积<sup>[8]</sup>。PAI 是纤溶酶原激活物 (PA) 的生理性特异抑制物, 现已发现 4 种不同类型的 PAI (PAI-1、PAI-2、PAI-3、PAI-4), 均有抑制 PA 的作用, 其中 PAI-1 是 PAI 的主要形式, 也是 PA 最重要的抑制剂, PAI-1 能抑制纤维蛋白水解和 ECM 降解, 导致或促进组织器官纤维化和硬化。PA/PAI 是参与调节 ECM 的重要酶系, 它不仅直接参与 ECM 的降解, 而且是其他 ECM 降解系统的上游系统, 能促进基质金属蛋白酶家族 (MMPs) 的表达上调<sup>[9]</sup>。Zhang 等<sup>[10]</sup>发现, PAI-1 是一个重要的促纤维化因子, 其作用可能是通过促进上皮细胞转分化为肌成纤维细胞途径来实现的。Eddy<sup>[11]</sup>发现在肾间质纤维化大鼠的肾组织中 PAI-1 表达上调, 认为在细胞和分子水平 PAI-1 有望成为治疗肾间质纤维化的一个有效靶点。

双环醇是一种抗肝炎新药。研究发现, 双环醇不仅能抑制病毒的复制, 降低多种肝损伤后转氨酶升高的水平, 而且对不同类型的肝纤维化有明显的抑制作用<sup>[12]</sup>, 有研究表明双环醇能使慢性乙型肝炎患者血清炎症介质 TNF- $\alpha$  显著降低, 提示双环醇可能具有抑制肝纤维化的作用<sup>[13]</sup>。另有研究表明, 双环醇具有较好的抗肝纤维化作用, 而且随着治疗时间的延长, 疗效更加显著<sup>[14]</sup>。

本研究利用 UUO 大鼠模型, 研究双环醇对大鼠肾间质纤维化的可能作用。结果显示, 术后第 7 天肾间质可见炎性细胞浸润, 肾小管上皮细胞胞浆疏松、肿胀和空泡变性, 部分肾小管扩张, 间质水肿、增宽, 细胞及 ECM 增多, 皮质区和皮髓交界区出现纤维化, 并且随时间延长, 病变逐渐加重。治疗组肾间质炎性细胞浸润减轻, 肾小管扩张、萎缩明显改善, 肾间质纤维化面积减少, 肾间质损伤指数均明显降低。免疫组化和 RT-PCR 结果均显示治疗组大鼠肾脏 PAI-1 表达量较同一时间点模型组显著降低,

说明双环醇可能通过抑制 PAI-1 在肾组织的表达, 使 ECM 降解增多, ECM 积聚减少, 而发挥其减轻肾间质纤维化的作用。相关分析结果显示, 肾组织 PAI-1、PAI-1 mRNA 的表达量与肾小管间质损伤评分 (TIS)、肾间质纤维化相对面积均呈明显正相关。

综上所述, PAI-1 过度表达可能是导致肾间质纤维化的机制之一, 而双环醇可以通过抑制 UUO 大鼠肾组织中 PAI-1 的表达, 延缓间质纤维化的进程, 对肾脏发挥保护作用。

## [参 考 文 献]

- [1] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis[J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 15 (3-4): 290-301.
- [2] Gipson DS, Gibson K, Gipson PE, Watkins S, Moxey-Mims M. Therapeutic approach to FSGS in children [J]. *Pediatr Nephrol*, 2007, 22(1): 28-36.
- [3] Li M, Liu GT. Inhibition of Fas/FasLmRNA expression and TNF- $\alpha$  release in concanavalin A-induced liver injury in mice by bicyclol[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(7): 1775-1779.
- [4] Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2009, 75(11): 1145-1152.
- [5] Pang M, Kothapally J, Mao H, Tolbert E, Ponnusamy M, Chin YE, et al. Inhibition of histone deacetylase activity attenuates renal fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297(4): 996-1005.
- [6] Cregger M, Berger AJ, Rimm DL. Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2006, 130(7): 1026-1030.
- [7] Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure[J]. *Intern Med*, 2004, 43(1): 9-17.
- [8] 张爱青, 甘卫华, 丁桂霞, 龚晶. 外源性结缔组织生长因子对大鼠肾小管上皮细胞胶原 III 合成的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(2): 188-190.
- [9] Villar SR, Brandoni A, Torres AM. Time course of organic anion excretion in rats with bilateral ureteral obstruction; role of organic anion transporters (Oat1 and Oat3) [J]. *Nephron Physiol*, 2008, 110(3): 45-56.
- [10] Zhang G, Kernan KA, Collins SJ, Cai X, Lopez-Guisa JM, Degen JL, et al. Plasmin (ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition; role of plasmin-activated signals[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(3): 846-859.
- [11] Eddy AA. Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis[J]. *Thromb Haemost*, 2009, 101(4): 656-664.
- [12] 何生松, 徐标, 韩春荣. 双环醇对小鼠日本血吸虫病肝纤维化即早基因与 TGF- $\beta$ 1, TIMP-1 及胶原表达的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(35): 3678-3684.
- [13] 王喜红. 百赛诺治疗慢性乙型肝炎早期肝硬化临床观察[J]. *临床医药实践杂志*, 2005, 14(1): 43-44.
- [14] 赵冬梅, 孙韬, 李燕. 双环醇对大鼠肾脏缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. *药学报*, 2002, 37(6): 412-414.

(本文编辑: 王霞)