维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)01-0063-03

特异性环氧化酶-2 抑制剂对狼疮小鼠肾组织 PAI-1 表达的影响

钟 清,甘 华,肖 刚

(重庆医科大学附属第一医院肾内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨特异性环氧化酶(COX)-2 抑制剂(Rofecoxib)对 MRL/lpr 自发狼疮小鼠肾脏纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)表达的影响。方法:12w 龄雌性 MRL/lpr 自发狼疮小鼠予以 Rofecoxib[10mg/(kg·d)]灌胃治疗,12w 后观察 Rofecoxib 对小鼠尿蛋白、血肌酐的影响。放免法测定血清血管紧张素 II、尿 TXB_2、尿 6-Ket-F1α 的水平;用免疫组化方法观察小鼠肾组织 PAI-1 的表达及肾组织病变程度,并与对照组比较。结果:治疗 12w 后,治疗组与对照组相比:尿蛋白排泄量、肌酐水平、血管紧张素 II 及尿 TXB_2 水平均有明显下降,差异有显著性;肾组织细胞外基质的沉积明显减少及肾组织 PAI-1 的表达降低($P<0.05$);尿 6-Ket-F1α 差异无显著性($P>0.05$)。结论:特异性 COX-2 抑制剂可以抑制 MRL/lpr 自发狼疮小鼠肾组织 PAI-1 的表达,降低尿蛋白,减少细胞外基质的沉积,从而减轻肾小球硬化,对狼疮性肾炎肾损害具有良好的治疗作用。

【关键词】特异性环氧化酶-2 抑制剂;纤溶酶原激活物抑制剂-1;狼疮肾炎

【中国图书分类法分类号】R593.241 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-08-06

Influence of specific cyclooxygenase-2 inhibitor on the expression of plasminogen activator inhibitor type-1 in lupus MRL/lpr mice.

ZHONG Qing, et al

(*Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of specific cyclooxygenase-2 inhibitor (Rofecoxib) on the expression of plasminogen activator inhibitor type-1 in MRL/lpr mice. *Methods*: 12-week female MRL/lpr mice were given Rofecoxib [10mg/(kg·d)] for 12 weeks. Changes in proteinuria, serum creatinine and pathology in renal were observed. Suppressive effect of the drugs on angiotensin II and urinary thromboxane B_2 and 6-Keton-prostaglandin-$F_{1\alpha}$ were determined by using radio-immunological assay. Immunolhistological analysis was used to examine the expression of PAI-1 in renal tissue. *Results*: Compared with the ones in the control group, mice treated with Rofecoxib had lower levels of proteinuria, serum creatinine, serum angiotensin II, urinary thromboxanc B_2 ($P<0.05$). The PAI-1 expression and deposition of extracellular matrix in renal tissue significantly decreased ($P<0.05$). The level of 6-Keton-prostaglandin-$F_{1\alpha}$ was not significantly different ($P>0.05$). *Conclusion*: Rofecoxib may decrease proteinuria and ameliorate progressive glomerular sclerosis by inhibiting partly the expression of PAI-1 by decreasing the deposition of extracellular matrix and accelerating its degradation. The specific cyclooxygenase-2 inhibitor has a renoprotective effect on MRL-lpr/lpr mice.

【Key words】specific cyclooxygenase-2 inhibitor; plasminogen activator inhibitor type-1; lupus nephritis

肾脏中前列腺素(prostaglandin,PG)的合成非常活跃,PG 在多方面调节肾脏的生理功能,诸如肾脏血流动力学、肾素分泌和肾小管钠水重吸收。环氧化酶(COX)是 PG 合成的限速酶,已知 COX 有两个同功酶,COX-1 催化生成的 PG 主要调节正常组织细胞的生理功能,维持自身代谢的稳定;COX-2 在生理条件下低表达,在 LN 小鼠的肾内表达增高,COX-2 的代谢产物 TXA2 的产生也增多[1]。人类各型狼疮性肾炎肾小球中纤溶酶原激活物抑制剂 I(I-type plasminogen activator ibhibitor, PAI-1)均过度表达,且 PAI-1 的表达与病变肾小球内细胞增生呈正相关,PAI-1 在狼疮性肾炎的发生发展过程中可能起着重要作用[2]。血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)通过刺激血管活性物质和细胞因子的产生,使细胞外基质(extracellular matrix,

作者介绍:钟 清(1964-),女,硕士,副主任医师,
主要研究方向:自身免疫性疾病的发病机理及防治。

维普资讯 http://www.cqvip.com

ECM)进行性积聚,并通过直接或间接上调 PAI-1 的表达,抑制 ECM 的降解。阻断肾素 - 血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)能延缓肾脏病的进展,部分是由 PAI-1 的表达减少及活性受抑所致。我们用自发狼疮小鼠观察了选择性 COX-2 抑制剂 Rofecoxib 对 MRL/lpr 小鼠狼疮性肾炎 PAI-1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及治疗

MRL/lpr 小鼠(12 只,雌性,3 月龄)购自中国科学院上海实验动物中心,体重 20 ~ 30g,随机分成两组,每组 6 只,饲以普通饲料。其中①空白对照组 6 只,予同体积的 0.5%羧甲基纤维素水灌胃 12w。②Rofecoxib 组 6 只,予含 Rofecoxib [10mg/(kg·d)]的 0.5%羧甲基纤维素水灌胃 12w。

1.2 尿蛋白、血清肌酐、血管紧张素 II(AngII)、尿 6-酮前列腺素 $F_{1\alpha}$(6-Ket-$F_{1\alpha}$)、尿血栓烷 B_2(TXB_2)的测定

采用代谢笼准确测量动物 24h 尿量,用马斯亮蓝法测定尿蛋白排泄量,尿蛋白总量 > 3mg/24h 为蛋白尿。实验结束时于各小鼠眶后静脉丛采血,血清置 -20℃保存,采用 Jaffe 法测定血清肌酐、放射免疫法测定 AngII、尿 6-Ket-$F_{1\alpha}$、尿 TXB_2 水平 (试剂盒由解放军总医院科技开发中心放免所提供)。

1.3 肾组织常规病理分析

于实验终点,处死动物后取肾组织,2%的福尔马林固定、脱水、石蜡包埋、制备 3μm 切片,经 PAS、HE、PAM 染色,进行光镜。

1.4 肾组织 PAI-1 蛋白检测

免疫组化(ABC 法):羊抗小鼠 PAI-1(博士德公司产品)为 I 抗,生物素标记的羊抗兔 IgG 为 II 抗,ABC 法检测 Rofecoxib 组、对照组肾组织 PAI-1 蛋白的表达,切片经 DAB 显色,PAI-1 表达部位呈棕黄色。

1.5 计算机图像分析

应用北航医学病理图象定量分析系统,通过光学显微镜放大 400 倍摄取图像,输入图像分析系统内。肾小球系膜基质增生半定量分析取 PAS 染色切片,每张化切观察 5~10 个正切肾小球,计数肾小球系膜区面积占整个肾小球面积的百分比。每张组化切片随机选取 10 个视野,结果以阳性目标总面积 / 统计场总面积(面密度值)表示。

1.6 统计方法

结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计量资料比较采用 t 检验,由 SAS 软件完成。

2 结 果

2.1 24h 尿蛋白排泄量、血肌酐、AngII、尿 6-Ket-$F_{1\alpha}$、尿 TXB_2 及 6-Ket-$F_{1\alpha}$ 测定结果

实验结束后,Rofecoxib 组小鼠尿蛋白排泄量、血肌酐水平、AngII、尿 TXB_2 水平明显低于对照组,两组比较差异有显著性($P<0.05$);Rofecoxib 组小鼠尿 6-Ket-$F_{1\alpha}$ 水平与对照组比较差异无显著性($P>0.05$)见表 1。

表 1 尿蛋白、血肌酐、AngII、TXB_2 及 6-ket-$F_{1\alpha}$ 比较($\bar{x}\pm s$)

项目	对照组	Rofecoxib组
尿蛋白(mg/d)	8.6 ± 0.2	5.0 ± 1.0*
血肌酐(umol/L)	483.1 ± 240.9	173.6 ± 134.8**
AngII(mg/d)	142.4 ± 60.70	77.81 ± 30.26**
TXB_2(pg/)	1829.80 ± 777.57	992.25 ± 1204.5**
6-ket-$F_{1\alpha}$(umol/L)	15502 ± 7681.5	13611 ± 8742.8

注:与对照组比较:*$P<0.05$,**$P<0.01$

2.2 肾组织病理检查

实验结束后,Rofecoxib 组小鼠肾小球 ECM 面积与肾小球面积的比值明显减少,与对照组比较差异有显著性($P<0.01$)见表 2、图 1。

2.3 MRL/lpr 小鼠肾组织 PAI-1 蛋白检测结果

免疫组织化学分析显示,对照组小鼠肾小球和肾间质 PAI-1 表达呈强阳性反应;Rofecoxib 组小鼠肾小球和肾间质 PAI-1 表达呈弱阳性反应,两组比较差异有显著性($P<0.05$)见表 2、图 2。

表 2 肾组织病理改变及 PAI-1 面密度值比较($\bar{x}\pm s$)

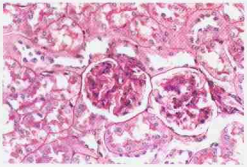
项 目	对照组	Rofecoxib组
系膜区 / 肾小球面积(%)	43.8 ± 6.93	35.7 ± 9.73*
面密度值	0.43 ± 0.08	0.21 ± 0.05*

注:与对照组比较:*$P<0.05$,**$P<0.01$

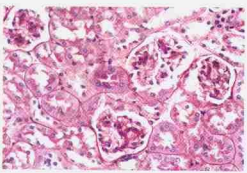
3 讨 论

本研究结果发现,应用 Rofecoxib 后,其缩血管前列腺素 TXA_2 的代谢产物 TXB_2 明显减少,狼疮小鼠 24h 尿蛋白排泄量下降,肾功能有所改善。本实验还发现 Rofecoxib 组和对照组小鼠扩血管前列腺素 PGI_2 的代谢产物 6-Ket-$F_{1\alpha}$ 没有变化,提示选择性 COX-2 抑制剂仅仅拮抗 COX-2 诱导的病理性 PGS 的产生,不影响生理性 PGS 的功能。在培养的

维普资讯 http://www.cqvip.com

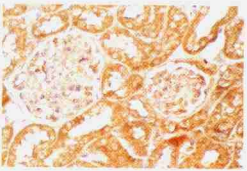


① 对照组小鼠细胞外基质明显增多（PAS×400）

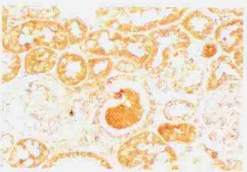


②Rofecoxib 组小鼠细胞外基质增多不明显（PAS×400）

图 1 肾组织 PAS 染色



①对照组小鼠肾小球和肾间质 PAI-1 强阳性表达



②Rofecoxib 组小鼠肾小球和肾间质 PAI-1 弱阳性表达

图 2 免疫组化染色检测 PAI-1(SABC×400)

系膜细胞中扩血管的 PGE_2 和 PGI_2 抑制其增殖和细胞外基质的沉积，而缩血管 $PGF_{2\alpha}$ 和 TXA_2 则刺激其增殖[9]。与对照组比较，应用 Rofecoxib 后，MRL-lpr/lpr 自发狼疮小鼠肾组织细胞外基质的沉积明显减少，同时能减少免疫复合物在肾小球基底膜沉积，降低蛋白尿，改善肾功能。

大量的体外实验显示，血管紧张素 II 能够刺激 PAI-1 的产生[10]。Moll 等发现在狼疮性肾炎模型中病变肾小球 PAI-1 的表达升高[9]，原位杂交结果提示，PAI-1 的表达与肾脏损伤程度呈正相关[10]。本研究显示，应用 Rofecoxib 后，MRL/lpr 小鼠血管紧张 II 水平明显低于对照组，免疫组化发现其肾组织 PAI-1 的表达较对照组减少。PAI-1 是体内已知的活性最强的纤溶酶原激活物抑制剂。活性纤溶酶原激活物不仅可以催化纤溶酶原转化为活性的纤溶酶，促进纤维蛋白的溶解过程，还可以通过活化基质金属蛋白酶（MMP）-2 前体而激活 MMP 系统，激活 ECM 的降解过程，PAI-1 的增加能抑制纤维蛋白和细胞外基质降解。研究证实 COX-2 在肾脏的表达定位于肾皮质致密斑及髓襻升支粗段并在限盐或肾大部切除术后表达增加，表明其代谢产物在致密斑介导肾素释放调节中起作用[9]。RAS 在肾小球硬化进程中起重要作用，血管紧张素 II 可以通过影响转化生长因子 β_1 和 PAI-1 及基质金属蛋白酶家族引起细胞外基质的积聚，造成肾小球硬化，应用血管紧张素 II 受体拮抗剂可以延缓肾小球硬化进展，保护肾功能。大量的体外实验显示，血管紧张素 II 能够刺激 PAI-1 的产生[9]。本研究表明，选择性 COX-2 抑制剂能降低狼疮小鼠血管紧素 II 水平，减小 PAI-1 蛋白在肾组织的表达，减少细胞外基质的分泌并促进其降解，肾功能损害减轻，从而减轻和延缓肾小球硬化的发生与发展。近年研究显示，与消炎痛等传统的非甾体类抗炎药相比，特异性 COX-2 抑制剂确能改善肾大部切除大鼠、糖尿病大鼠的肾脏病变[10]。

综上，使用 Rofecoxib 明显减轻了 MRL/lpr 小鼠的蛋白尿、细胞外基质的沉积，COX-2 的代谢产物 TXB_2 也明显减少，降低 AngII 水平。免疫组织化学显示，肾组织 PAI-1 蛋白质表达减少，提示 COX-2 的活性部份受抑制。特异性 COX-2 抑制剂能减轻小鼠肾组织炎症反应，明显保护肾小球的结构和功能，这些改变部分作用是通过抑制肾素的释放而抑

（下转第 77 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

治疗要高，这表明二者之间可能产生协同作用，更进一步地诱导细胞凋亡。

细胞凋亡是生命科学的研究热点之一，广泛存在于生理及病理过程中。细胞凋亡与增殖的失衡是肿瘤发生、发展的重要原因，而诱导肿瘤细胞凋亡已成为治疗恶性肿瘤的一个重要研究方向。射频治疗兔肝癌模型中诱导细胞凋亡是其治疗的一个重要机制[8]。在本实验结果表明 RFA 治疗后除造成组织变性、坏死、崩解、液化、炎性细胞浸润等病理现象外，还可以大量诱导肿瘤细胞的凋亡，其发生的部位主要是肿瘤的周边区域。通过对比实验研究，RFA 的确能诱导肝癌细胞大量凋亡，而肿瘤经射频治疗后形成坏死区的大小并不是评价射频直接治疗效果的唯一指标。

增殖细胞核抗原是一种核蛋白，它参与 DNA 的合成和修复[9]，仅在增殖的细胞中表达，为评价细胞增殖活性的重要指标之一。较高的 PCNA LI 预示着较高的肿瘤细胞增殖活性及较高的肿瘤组织侵犯特性[10]。本研究应用免疫组化 SABC 法检测肝癌中 PCNA 的表达，结果显示经射频联合表阿霉素治疗组的肝癌细胞凋亡指数明显高于单纯射频组和单纯药物注射组，癌细胞增殖指数下降；细胞凋亡与增值呈明显负相关。从而说明射频消融联合表阿霉素治疗肝癌可以明显诱导肝癌细胞凋亡，同时抑制癌细胞增殖。

总之，本实验通过射频联合化疗药物局部治疗肝癌显示这种治疗方式较单纯治疗的效果更理想，有望进一步推动临床的应用。关于射频联合化疗药物治疗如何诱导凋亡相关基因的表达，尚有待于分子基因水平的进一步研究。

参 考 文 献

[1] 王 荞,王 佚,王少春,等.兔 VX2 肝癌模型的建立及超声影像监测的研究[J]. 重庆医科大学学报,2003;28(5): 585-588.

[2] Chen WX, Jing LJ. Differentiation between apoptosis and necrosis [J]. Zhonghua Xibao Shengwuxue Zazhi (Chin J Cell Biol), 1998; 20(2): 58-63.

[3] 鲍恩武, 马庆久, 赖大年, 等.射频治疗原发性肝癌前后可溶性白细胞介素 -2 受体和肿瘤坏死因子的变化[J]. 肝胆外科杂志,2003;11(4): 278-279.

[4] Miao Y, Ni Y, Mulier S, et al. Ex vivo experiment on radio frequency liver ablation with saline infusion through a screw-tip cannulated electrode [J]. J Surg Res, 1997; 71:19-24.

[5] Livraghi T, Goldberg SN, Monti F, et al. Saline-enhanced radiofrequency tissue ablation in the treatment of liver metastases [J]. Radiology, 1997; 202:205-210.

[6] 韩 锐.肿瘤的化学预防及药物治疗[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1991; 267-268.

[7] 许崇恩,寿楠海,姜希宏,等.中国现代普通外科进展[J]. 1999; 2(3): 24-27.

[8] 王笛乐,沈世强,章 园.射频消融对兔肝癌模型细胞凋亡的影响[J]. 临床外科杂志,2004;12(3): 147-149.

[9] Gramantieri L, Trere D, Chieco P, et al .In human hepatocellular carcinoma in cirrhosis proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is involved in cell proliferation and cooperates with P21 in DNA repair [J]. J Hepatol, 2003; 39(6): 997-1003.

[10] Ebelt, Neid M, Tannapfel A, et al. Prognostic significance of proliferation markers in hepatocellular carcinoma (HCC) [J]. Zentralbl chir, 2000; 125:597-601.

（上接第 65 页）

制 RAS 系统；部分是由于抑制 PAI-1 蛋白质的表达，减少 ECM 的分泌并促进其降解，从而减轻进行性肾小球硬化的发生与发展。

参 考 文 献

[1] Emery P, Zeidler H, Kvien TK,et al. Celecoxib versus diclofenac in long-term management of rheumatoid arthritis: randomised double-blind comparison[J]. Lancet, 1999;354(9196): 2106-2111.

[2] 洪寅峰,张志刚,高 山.狼疮性肾炎中 u-PA 和 PAI-1 的表达及其意义[J]. 上海医学, 2001;24(3):169-172.

[3] Kelefiotis D, Bresnahan BA, Stratidakis I, et al. Eicosanoid-induced growth and signaling events in rat glomerular mesangial cells[J]. Prostaglandins, 1995;49(5):269-283.

[4] Oikawa T, Freeman M, Lo W, et al. Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: anew mechanism for the anti- fibrotic effect of rennin-angiotensin inhibition[J]. Kidney Int, 1997;51:164-170.

[5] Moll S, Moud PA, Fulpius T, et al. Induction of plasminogen activator inhibitor type 1 in murine lupus-like glomerulonephritis [J]. Kidney Int, 1995;48:1459-1469.

[6] Oikawa T, Freeman M, Lo W, et al. Modulation plasminogen activator inhibitor-in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin-angiotensin inhibition[J]. Kidney Int, 1997;51:164.

[7] Correa-Rotter R, Hostetter TH, Manivel JC, et al. Renin expression in ablation[J]. Hypertension, 1992;20:483-490.

[8] Harris RC. Cyclooxygenase-2 in the kidney[J] .J Am Soc Nephrol, 2000;11:2387-2394.