

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)11-0968-03

依托昔布对大鼠单侧输尿管梗阻肾脏病变的影响

朱文侠 韩振奎 杨 玲 (延安大学医学院局解手术学教研室 陕西 延安 716000)

Protective effect of etoricoxib on unilateral ureteral obstructive nephropathy in rats

ZHU Wen-Xia, HAN Zhen-Kui, YANG Ling

Department of Regional Surgery, Medical College, Yan'an University, Yan'an 716000, China

【Abstract】 AIM: To observe the effects of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, etoricoxib, on the progression of renal lesion and fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction.

METHODS: The rats were randomly divided into control group, unilateral ureteral obstruction group, and etoricoxib group. The pathological changes of renal tissues and blood creatinine, urea nitrogen, and nitric oxide (NO) were detected, and the expressions of TGF- β 1 and COX-2 in the renal tissues were researched by means of immunohistochemical method. **RESULTS:** Three weeks after unilateral ureteral obstruction, the animals of unilateral ureteral obstruction group and etoricoxib group showed obvious renal lesion and fibrosis; the concentrations of blood creatinine [$(38.10 \pm 3.93, 27.80 \pm 2.57)$ mL/min], urea nitrogen [$(9.18 \pm 0.03, 8.14 \pm 0.03)$ mmol/L], NO [$(6.01 \pm 0.17, 4.47 \pm 0.12)$ mmol/L] and expressions of TGF- β 1 ($2.41 \pm 0.19, 1.38 \pm 0.13$) and COX-2 ($2.74 \pm 0.07, 1.52 \pm 0.05$) in the renal tissues increased significantly compared with those in the animals of control group. However, all items were also different between unilateral ureteral obstruction group and etoricoxib group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Selective cyclooxygenase-2 inhibitor etoricoxib can relieve renal lesion and fibrosis of unilateral ureteral obstructive nephropathy.

【Keywords】 ureteral obstruction; fibrosis; cyclooxygenase-2; etoricoxib

【摘要】目的 观察选择性环氧合酶-2 抑制剂依托昔布对单侧输尿管梗阻大鼠肾脏病变的影响。方法 将大鼠随机分为单侧输尿管梗阻组、依托昔布治疗组和对照组进行实验,测定血肌酐、尿素氮和肾皮质 NO 含量,并用免疫组化法半定量测定肾组织 TGF- β 1 和 COX-2 的表达水平。结果 单侧输尿管结扎术后 3 wk,单侧输尿管梗阻组和用药组大鼠肾脏均可见明

显病理改变与纤维化,血肌酐 ($38.10 \pm 3.93, 27.80 \pm 2.57$) mL/min,尿素氮 ($9.18 \pm 0.03, 8.14 \pm 0.03$) mmol/L 和肾皮质 NO 含量 ($6.01 \pm 0.17, 4.47 \pm 0.12$) mmol/L 均比对照组 [(22.30 ± 2.28) mL/min, (6.53 ± 0.02) mmol/L, (1.65 ± 0.11) mmol/L] 显著性升高,肾组织 TGF- β 1 ($2.41 \pm 0.19, 1.38 \pm 0.13$) 和 COX-2 ($2.74 \pm 0.07, 1.52 \pm 0.05$) 的表达水平显著性上调。用药组与单侧输尿管梗阻组比较,病理改变与纤维化程度、血肌酐、尿素氮和肾皮质 NO 含量、肾组织 TGF- β 1 和 COX-2 的表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 特异性 COX-2 抑制剂依托昔布能减轻单侧输尿管梗阻大鼠肾脏病理损伤和纤维化改变。

【关键词】 输尿管梗阻 纤维化 环氧合酶-2 依托昔布

【中图分类号】 R971 R692 **【文献标识码】** A

0 引言

环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 包括 COX-1 和 COX-2 两种同工酶,目前认为是前列腺素代谢环节中的关键性限速酶,COX-1 参与正常生理过程,而 COX-2 可介导病理改变^[1]。研究结果显示,COX-2 大量生成在输尿管梗阻所引发的肾小管间质纤维化过程中起重要作用^[2],并发现 COX-2 在肾皮质的过度表达可能是肾内炎性细胞浸润和聚集的起始或促进因素之一。而临床上用非甾体类抗炎药 (nonsteroid anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 治疗肾脏炎性疾病引起不良反应可能与 NSAIDs 在阻断 COX-2 催化的病理性前列腺素合成的同时,也阻断了 COX-1 催化的生理性前列腺素的合成有关。为了探讨通过选择性地阻断 COX-2 的合成,避免 NSAIDs 的不良反效应的有效途径^[3],我们用单侧输尿管梗阻大鼠模型^[4],观察肾组织中 COX-2 和 TGF- β 1 的改变及其在输尿管梗阻所致肾损伤的发生发展中的作用,并观察选择性 COX-2 抑制剂依托昔布 (Etoricoxib) 对梗阻性肾病发生发展的影响及对肾脏的保护作用,为治疗相关肾脏损伤提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 180 ~ 220 g,中国医学科学院实验动物中心提供,饲养环境保持通风,湿度 55%,温度 22℃,昼夜灯光照明,定期消毒笼具。依托昔布由北京欣经科生物技术有限公

收稿日期 2006-09-05; 接受日期 2006-11-27

作者简介 朱文侠,本科,副教授。Tel (0911) 2226590 Email yzwx@

126.com

司提供。山羊抗大鼠 COX-2 多克隆抗体、兔抗大鼠 TGF- β 1 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 单侧输尿管梗阻模型 动物平均分为对照组、单侧输尿管梗阻组和依托昔布治疗组。对照组除不结扎和剪断输尿管外,其余步骤同其它两组。治疗组于术前 24 h 开始给予依托昔布,每日 10 mg/kg 溶于 1 mL 生理盐水中灌胃,梗阻组仅以等量生理盐水灌胃。0.1 g/L 水合氯醛 350 mg/kg 腹腔注射麻醉梗阻组和依托昔布治疗组大鼠。于背部左侧纵形切开皮肤,钝性分离肌肉,暴露左侧肾脏,分离输尿管,分别在紧贴肾门处及远端结扎输尿管,于两结扎处之间剪断,逐层缝合肌肉、皮肤,以碘伏消毒。术后肌肉注射罗氏芬预防感染,每日 1.5 mg/kg,连续 3 d。肾脏取材与保存 术后第 3 周,在采集血液标本后,手术取出大鼠左肾,剥离肾包膜,将肾脏沿纵轴剖开,取适量皮质组织作 NO 含量测定用,其余组织迅速保存在中性甲醛中,以备组织学染色和免疫组织化学染色用。

1.2.2 血液生化指标测定 将术后第 3 周采集血液标本离心,取血清,在全自动生化分析仪上测定血肌酐与尿素氮。

1.2.3 肾皮质 NO 含量测定 取约 0.5 g 左肾组织,加入 4 mL 4℃ 生理盐水中,用玻璃匀浆器在冰水浴中研磨制成匀浆,4℃,1000 r/min,离心 5 min,取上清液 -20℃ 保存待测。用硝酸还原酶法测定 NO 含量,按试剂盒检测步骤,分别在空白管、标准管、测定管中滴加试剂,混匀,37℃ 水浴 60 min,再次滴加试剂,充分旋涡混匀 30 s,室温静置 10 min,4000 r/min 离心 10 min,取上清,分别加入显色剂,混匀,室温静置 10 min,蒸馏水调零,550 nm,0.5 cm 光径比色测定各管吸光度值,NO 含量($\mu\text{mol/L}$)=[(样品管吸光度 - 空白管吸光度)或(标准管吸光度 - 空白管吸光度) \times 标准值] \div 样品的蛋白浓度(g/L)。

1.2.4 Masson 和免疫组织化学染色 肾组织固定后石蜡包埋,3 μm 连续切片。Masson 染色:切片脱蜡水化,蒸馏水浸洗 3 次,每次 3 min。用 Masson 复合染液浸染 10 min,冰醋酸冲洗。磷钨酸分化 10 min,冰醋酸冲洗。苯胺蓝染色 4 min,冰醋酸冲洗。最后用蒸馏水浸洗 2 次,每次 5 min。干燥后用中性树脂封片。免疫组织化学染色:切片脱蜡水化后,用 PBS (pH 7.4, 10 mmol/L) 浸洗。内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育, PBS 洗后浸入柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0, 10 mmol/L),微波修复 (2450 MHz, 800 W),加蒸馏水 50 mL 后冷却。PBS 液浸洗,用正常山羊血清封闭,室温孵育。倾去血清,加入一抗(兔抗大鼠 TGF-

β 1 抗体 1:400 稀释;山羊抗大鼠 COX-2 抗体 1:100 稀释) 4℃ 冰箱过夜,复温, PBS 浸洗。滴加生物素化抗兔或抗山羊二抗,室温孵育。PBS 液浸洗,再滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶,室温孵育。PBS 液浸洗,显色剂 DAB 显色,自来水充分冲洗,苏木素复染,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察。以正常兔或山羊血清代替一抗作阴性对照,免疫组化结果均为阴性。

1.2.5 结果判定 肾小管间质病变(肾小管扩张或萎缩、间质细胞浸润及间质纤维化)程度的判定按 Piraini 法评分(0 分:小管间质无病变;1 分:轻度病变,范围 <20%;2 分:中度病变,范围 20% ~ 40%;3 分:重度,病变范围 >40%)。每例切片记录连续不重叠的 20 个低倍视野的数值,取平均值。对 TGF- β 1 和 COX-2 的表达根据着色范围进行半定量分析(0 分:无着色;0.5 分:微量着色,面积占整个视野的 10% 以下;1 分:轻度着色,着色面积占整个视野的 10% ~ 30%;2 分:中度着色,着色面积占整个视野的 30% ~ 50%;3 分:广泛着色,着色面积占整个视野的 50% 以上)。每例切片记录 20 个连续不重叠的肾皮质间质高倍视野(尽量避开肾小球和大血管),取平均值。

统计学处理:实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 做统计分析,所用统计方法为方差分析, $P < 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 肾脏大体形态与病理学所见 梗阻组动物左侧肾脏输尿管结扎术后 3 wk,肾脏明显肿大,颜色变浅,剖面呈缺血状,以肾皮质为重。肾盂、肾盏扩张明显,充满尿液,肾实质变薄,皮髓质界限模糊不清。经 Masson 染色后对照组比较,肾间质明显增宽,其中有大量炎症细胞浸润,间质纤维化明显。与治疗组比较,依托昔布能够明显地改善单侧输尿管梗阻时的病理改变,镜下可见间质内炎症细胞减少,纤维化明显减轻。

2.2 生化指标 输尿管结扎术后 3 wk,梗阻组和治疗组尿素氮与血肌酐定量均比对照组升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明梗阻性肾的损伤。而治疗组与梗阻组之间尿素氮与血肌酐定量差异有统计学意义($P < 0.05$)表明依托昔布对肾损伤有保护作用(表 1)。

2.3 肾组织匀浆 NO 含量变化 术后 3 wk,三组比较,肾皮质匀浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量变化非常显著,治疗组与梗阻组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。表明 NO 参与了梗阻性肾损伤的发生发展过

程,而依托昔布可以降低 NO 的合成。

表1 尿素氮、血肌酐、NO 含量及 TGF- β 1 COX-2 半定量计分比较 (n=7, $\bar{x} \pm s$)

组别	尿素氮 (mmol/L)	血肌酐 (mL/min)	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ (mmol/L)	TGF- β 1	COX-2
对照	6.53 \pm 0.02	22.30 \pm 2.28	1.65 \pm 0.11	0.26 \pm 0.12	0.21 \pm 0.04
梗阻 ^a	9.18 \pm 0.03	38.10 \pm 3.93	6.01 \pm 0.17	2.41 \pm 0.19	2.74 \pm 0.07
治疗 ^{ab}	8.14 \pm 0.03	27.80 \pm 2.57	4.47 \pm 0.12	1.38 \pm 0.13	1.52 \pm 0.05

^aP < 0.05 vs 对照; ^bP < 0.05 vs 梗阻。

2.4 肾小管间质 TGF- β 1 的表达 术后 3 wk, 三组比较, 肾小管间质 TGF- β 1 表达的免疫组织化学染色半定量计分差异有统计学意义 (P < 0.05)。梗阻组与治疗组比较差异有统计学意义 (P < 0.05, 表 1)。表明 TGF- β 1 参与了梗阻性肾损伤的发生发展过程, 而依托昔布可以降低 TGF- β 1 的生成。

2.5 肾小管间质 COX-2 的表达 治疗组和梗阻组与对照组比较 COX-2 表达明显增加, 而治疗组和梗阻组之间差异亦有统计学意义 (P < 0.01, 表 1)。表明 COX-2 参与了梗阻性肾损伤的发生发展过程, 而依托昔布可以减少 COX-2 的生成。

3 讨论

本研究中, 单侧输尿管梗阻大鼠在其梗阻 3 wk 后, 可见肾间质增宽, 炎症细胞浸润, 部分肾小管萎缩, 肾小管间质明显纤维化, 血肌酐与尿素氮水平上升, 表明肾功能受损。肾皮质匀浆 NO 含量升高, 肾小管间质 TGF- β 1 的表达和 COX-2 的表达上调, 提示二者参与了肾损伤的发生发展。单侧输尿管梗阻后使用依托昔布的大鼠, 肾功能损伤和肾小管间质纤维化程度明显减轻。据此我们推论, 依托昔布对于大鼠单侧输尿管梗阻病变具有保护作用。

目前已经开发出多种选择性 COX-2 抑制剂(可分为第一代和第二代), 临床上主要用于治疗风湿性关节炎和骨关节炎^[5-6], 然而有关选择性抑制 COX-2 对各种肾脏疾病影响的研究较少。有关学者^[7-8]用大鼠肾大部切除 2 wk 的模型研究发现, 肾脏致密斑及皮质升支粗段的 COX-2 表达显著增加, 而 COX-1

无明显变化, 使用 COX-2 抑制剂可以有效减少前列腺素的生成, 延缓肾小球硬化的病程进展。而用 COX-1 抑制剂却无效。有关学者^[9]提出, COX-2 在单侧输尿管梗阻小鼠肾皮质的过度表达很可能是肾内炎症细胞浸润和积聚的起始或促进因素之一, 但迄今尚未见 COX-2 与肾小管间质纤维化的相关性研究报道。本研究表明, COX-2 参与了单侧输尿管梗阻后肾损伤发生和发展的病理过程, 并在大鼠梗阻性肾损伤的肾间质纤维化的过程中有重要作用。同时发现, 第二代高特异性 COX-2 抑制剂依托昔布能够减轻肾功能损伤和肾组织纤维化进展, 抑制 NO 活性, 下调 TGF- β 1 和 COX-2 的表达, 从多方面发挥对梗阻性肾损伤的保护作用。

【参考文献】

- [1] Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2 [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998, 38: 97-120.
- [2] Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, et al. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues: Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids [J]. J Clin Invest, 1994, 93(3): 1095-1101.
- [3] Cryer B, Dubois A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase: A review [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 1998, 56(5-6): 341-361.
- [4] 邢国兰, 刘章锁, 文建国. 内皮素在单侧输尿管梗阻大鼠术侧肾脏的表达情况 [J]. 实用儿科杂志, 2005, 9(20): 893-895.
- [5] 宋洁, 刘章锁. 福辛普利联合氯沙坦对单侧输尿管梗阻大鼠肾脏肝细胞生长因子表达的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2004, 39(6): 960-963.
- [6] 陈南, 赵青, 王伟铭. 转化生长因子- β 刺激人近端肾小管上皮细胞结缔组织生长因子的表达 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2005, 14(2): 117-121.
- [7] Wang JL, Cheng HF, Zhang MZ, et al. Selective increase of cyclooxygenase-2 expression in a model of renal ablation [J]. Am J Physiol, 1998, 275(4Pt2): F613-F622.
- [8] Wang JL, Cheng HF, Shappell S, et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases proteinuria and retards progressive renal injury in rats [J]. Kidney Int, 2000, 57(6): 2334-2342.
- [9] 林洪丽, 陈香美, 程庆砾, 等. 单侧输尿管梗阻后小鼠肾脏环氧化酶-2 的表达及其意义 [J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(10): 945-947.

编辑 王小仲