

## 水蛭对肺纤维化大鼠 PAI-1 的影响

李晓娟<sup>1</sup>, 张骞云<sup>1</sup>, 蔡志刚<sup>2</sup>, 崔卫正<sup>3</sup>, 石玉珍<sup>2</sup>

(1. 沧州市中心医院 呼吸内二科, 河北 沧州 061001; 2. 河北医科大学第二医院 呼吸内科, 河北 石家庄 050000; 3. 邯郸市中心医院 呼吸内科, 河北 邯郸 056001)

**[摘要]** 目的: 观察水蛭对肺纤维化大鼠纤溶酶原激活物抑制因子-1 (Plasminogen activator inhibitor -1, PAI-1) 的作用, 并探讨其机制。方法: 采用气管内注入博莱霉素 (BLM) 制作大鼠肺纤维化模型, 造模后随机分为模型组 (MD 组, 生理盐水 6 ml/d 灌胃), 水蛭组 [HD 组, 水蛭粉 4 g/(kg · d) 灌胃], 另设鼠龄、体重相匹配的正常对照组 (NC 组), 每组 8 只; 28 d 后 ELISA 法测定血浆 PAI-1 含量及活性, 同时检测肺组织羟脯氨酸 (HYP) 含量。结果: NC 组 PAI-1 含量 ( $0.469 2 \pm 0.081 3$ )  $\mu\text{g/L}$ , 活性 ( $0.363 4 \pm 0.047 0$ ) Au/ml, 明显低于 MD 组和 HD 组 ( $P < 0.01$ ); MD 组 PAI-1 含量 ( $8.920 5 \pm 1.094 8$ )  $\mu\text{g/L}$ , 活性 ( $2.066 7 \pm 0.598 6$ ) Au/ml, 高于 HD 组 ( $3.479 8 \pm 0.487 2$ )  $\mu\text{g/L}$ , ( $1.225 3 \pm 0.199 4$ ) Au/ml ( $P < 0.01$ ); NC 组、HD 组 HYP 低于 MD 组 ( $P < 0.01$ )。结论: 水蛭可能通过减少凝血酶在肺内的表达, 抑制 PAI-1 生成及活性, 使重组尿激酶型纤溶酶原激活物 (Urokinase plasminogen activator, uPA) 活性升高, 减少纤维蛋白沉积, 对肺纤维化大鼠肺组织具有保护作用。

**[关键词]** 肺纤维化; 水蛭; 纤溶酶原激活物抑制物 1; 大鼠, Sprague-Dawley

**[中图分类号]** R563.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)02-0170-04

### Effects of Hirudo on the Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Rats with Pulmonary Fibrosis

LI Xiaojuan<sup>1</sup>, ZHANG Qianyun<sup>1</sup>, CAI Zhigang<sup>2</sup>, CUI Weizheng<sup>3</sup>, SHI Yuzhen<sup>2</sup>

(1. Department of Respiratory, Central Hospital of Cangzhou City, Cangzhou 061001, Hebei, China; 2. Department of Respiratory, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 3. Department of Respiratory, Central Hospital of Handan City, Handan 056001, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of hirudo on the expression of plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) in rats with pulmonary fibrosis, and to explore the mechanisms. **Methods:** The pulmonary fibrosis rat model was established by intratracheal instillation of bleomycin. Model rats were divided into bleomycin group (group MD) and hirudo group (group HD) with 8 rats in each group, and control group (group NC) composed of 8 healthy rats was set up. The rats of group MD were given normal saline 6 ml/d by gavage. The rats of group HD were given hirudo power 4g/(kg · d) by gavage. Plasma PAI-1 level and its activity were detected by ELISA, and hydroxyproline (HYP) contents of lung tissues were detected. **Results:** The PAI-1 level and its activity in group NC were significantly lower than those in the other two groups ( $P < 0.01$ ). The PAI-1 level and its activity in group MD were higher than those in group HD ( $P < 0.01$ ). The HYP content in group NC and group HD were lower than that in MD group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Hirudo can protect the lung tissue of rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis by decreasing thrombin expression in the lungs, inhibiting PAI-1 generation and its activity, increasing urokinase plasminogen activator (uPA) activity and reducing the fibrous protein deposition.

**[Key words]** pulmonary fibrosis; leeches; plasminogen activator inhibitor 1; rats, Sprague-Dawley

近年来,凝血酶在肺间质纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 发病中的作用逐渐引起人们的注意,凝

血酶可激活内皮细胞,作为炎症细胞和成纤维细胞的化学诱导物,刺激成纤维细胞增殖<sup>[1]</sup>和胶原的

产生<sup>[2]</sup>,从而促进纤维化的形成。水蛭是治疗血栓症的常用药物,主要活性成分为水蛭素,是凝血酶的特异性抑制剂<sup>[3]</sup>,能抑制凝血酶诱导的平滑肌细胞迁移和成纤维细胞增殖,抑制凝血酶对内皮细胞的刺激反应<sup>[4]</sup>。本实验通过检查 PF 大鼠血浆纤溶酶原激活物抑制因子 1(plasminogen activator inhibitor-1,PAI-1)的含量及活性,探讨水蛭对 PF 大鼠凝血系统的影响,为临床治疗 PF 开辟新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SD 清洁级雄性大鼠(由河北医科大学实验动物中心提供),体重 200 ~ 220 g。

### 1.2 方法

**1.2.1 试剂与仪器** 酶标仪,芬兰雷博;低温离心机,北京医用离心机厂;PAI-1ELISA 试剂盒,上海太阳生物技术有限公司;PAI-1 活性试剂盒,复旦大学分子遗传学研究室提供;羟脯氨酸试剂盒,南京建成生物工程开发有限公司提供;博来霉素(BLM)A5 针剂,天津太河制药有限公司生产,批号 050302。水蛭粉购于河北省中医药研究所。

**1.2.2 动物分组** 大鼠适应性饲养 5 d,经气管内注入 BLM 5 mg/kg 制作模型,于造模当日给予水蛭粉(4 g/kg)灌胃(按 50 ml 生理盐水配 4 g 水蛭粉)定为水蛭组(HD 组),用生理盐水代替水蛭粉灌胃定义为模型组(MD 组),另设正常对照组(NC 组)。所有大鼠自由饮水,标准大鼠饲料喂养。持续给药 28 d 后处死,每组随机取 8 只进行处理。

**1.2.3 检测指标** 大鼠左心室穿刺采血 2 ml,置于含有 1/10 体积 0.109 mol/L 枸橼酸钠抗凝剂的试管中,3 000 r/min 离心 10 min,收集上层血浆,测定 PAI-1 含量及活性,具体操作按试剂盒说明书进行。取大鼠肺组织湿重 90 ~ 100 mg,用样本碱水解法测羟脯氨酸(HYP)含量。

### 1.3 统计学处理

数据结果以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 11.0 统计软件行方差分析,两组间比较采用  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 动物一般情况

正常对照组一般情况好,动物被毛紧密贴身,

色白光泽,两眼有神活动敏捷,体重增加明显,唇及爪色淡红。模型组在成模后的 2 d 内外观与正常对照组无明显差异,运动活泼,被毛光泽;3 d 后出现轻度呼吸困难,伴爪及唇轻度紫绀,有不同程度的耸毛,精神萎靡,反应迟钝;10 d 后情况逐渐好转,水蛭组精神状态较模型组好。

### 2.2 肺病理改变

正常对照组肺组织未见明显病变;模型组可见支气管壁、肺间质大量胶原纤维呈束状或片状沉积,肺泡结构破坏,纤维化严重;水蛭组血管壁、肺泡间质仅有少量的胶原纤维增生,纤维化程度较模型组减轻。见图 1。

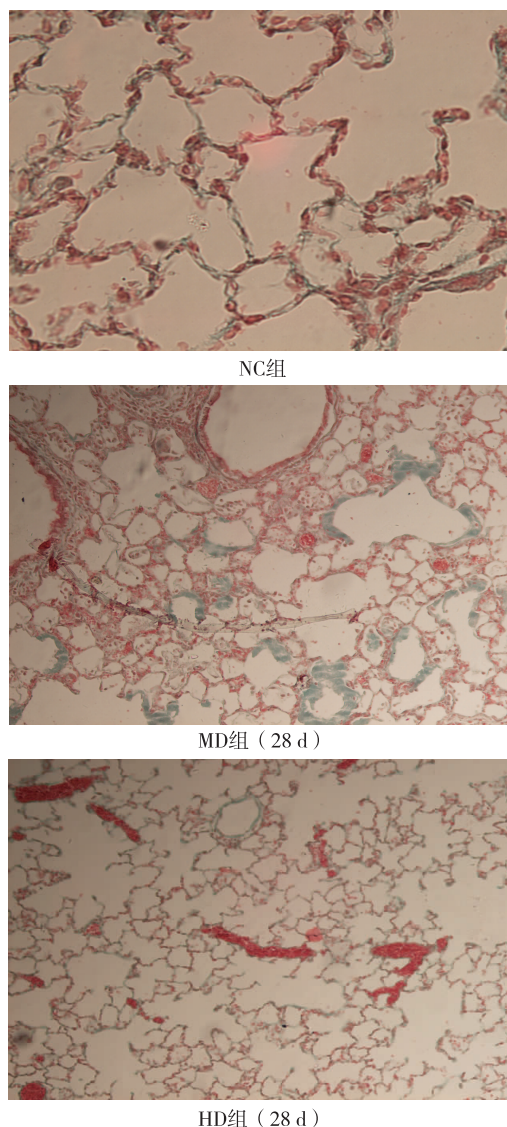


图 1 各组肺组织病理图片(Masson  $\times 200$ )

Fig. 1 Pathological picture of lung tissues in each group

2.3 血浆 PAI-1 含量、活性及肺组织 HYP 含量  
模型组血浆 PAI-1 含量明显高于其它各组 ( $P < 0.01$ ),水蛭组明显高于正常对照组 ( $P < 0.01$ )。PAI-1 活性:模型组、水蛭组明显高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ),水蛭组明显低于模型组 ( $P < 0.01$ )。HYP 含量:模型组显著高于水蛭组和正常对照组 ( $P < 0.01$ ),水蛭组高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠 PAI-1 水平及 HYP 含量( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of the PAI-1 levels and HYP contents of rats among different groups( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	PAI-1( $\mu\text{g/L}$ )	PAI-1 活性(Au/ml)	HYP(mg/g)
NC 组	8	0.469 2 $\pm$ 0.081 3	0.363 4 $\pm$ 0.047 0	0.245 8 $\pm$ 0.011 6
MD 组	8	8.920 5 $\pm$ 1.094 8 <sup>(1)</sup>	2.066 7 $\pm$ 0.598 6 <sup>(1)</sup>	0.906 9 $\pm$ 0.040 7 <sup>(1)</sup>
HD 组	8	3.479 8 $\pm$ 0.487 2 <sup>(1)(2)</sup>	1.225 3 $\pm$ 0.199 4 <sup>(1)(2)</sup>	0.742 2 $\pm$ 0.097 4 <sup>(1)(2)</sup>

注:与 NC 组比较, <sup>(1)</sup> $P < 0.01$ ;与 MD 组比较, <sup>(2)</sup> $P < 0.01$ 。

3 讨论

利用 BLM 气管内注入复制大鼠 PF 模型是目前国内外公认的研究方法。研究表明,注入 BLM 1~7 d,病变以肺泡炎为主,第 7 天时,肺泡炎达高峰,并开始出现肺泡间隔增厚,成纤维细胞及毛细血管增生,第 28 天形成稳定的 PF。本实验中,实验动物气管内滴入 BLM 第 28 天,大体观察肺表面凹凸不平,肺体积缩小,苍白,硬度增加,Masson 染色可见片状、条索状的胶原纤维,纤维化严重。HYP 是机体胶原蛋白的主要成分之一,不同组织中的 HYP 含量可作为衡量胶原组织代谢的重要指标。本实验中肺组织 HYP 含量较正常对照组明显升高,说明本实验采用 BLM 复制的动物模型是成功而稳定的。

随着对 PF 机制的深入研究以及相关的分子生物学技术的发展,纤溶系统在 PF 中的作用越来越受到重视。凝血酶可激活内皮细胞,作为炎症细胞和成纤维细胞的化学诱导物,刺激成纤维细胞增殖和胶原蛋白的产生,促进 PF 的形成<sup>[5]</sup>。纤维蛋白溶解是调节纤维蛋白沉积的另一系统,在纤溶酶原激活物(PA)的催化下形成的纤溶酶具有胰蛋白酶样作用,不仅可以降解纤维蛋白原和纤维蛋白,还可以降解多种细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分,包括纤维连接蛋白和层连蛋白;此外,纤溶酶又为基质金属蛋白酶(MMP)活化所必需。PA 和 PAI-1 在肺炎症所引起的纤溶酶活化中扮演着重要的角色。PAI-1 是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员之一,是纤溶系统的主要抑制物,PAI-1 也是 PA 高效的生理性抑制因子,其组织内水平的升高和活性的增强能够有效的抑制 PA 对纤溶酶的

活化,从而有效的抑制纤维蛋白水解和 ECM 降解,因而有可能促进组织内纤维蛋白沉积和 ECM 积聚,导致器官纤维化。在 PF 患者的 BALF 中,发现纤溶酶原的活性受到损害,而这种纤溶酶原活性的异常是由于 PAI-1 表达的增加所致。Eitzan<sup>[1]</sup> 和 Hattori 等<sup>[6]</sup>证实,PAI-1 在 PF 的病理过程中扮演重要角色,研究者对 PAI-1 缺陷的小鼠进行气管内灌注 BLM,发现它们对于胶原沉积有抵抗作用,PF 的程度减低;反之,PAI-1 过度表达的小鼠的 PF 明显。因此,可假定 PAI-1 基因的缺失使其避免了 BLM 导致的纤溶酶原活性的受损,纤溶酶原未受损或者表达增加可能减少了胶原的产生或增加了胶原的清除。另外一种假设则认为,PAI-1 促进了很多炎性细胞的迁移和黏附,通过这些炎性细胞以及它们所释放的细胞因子参与了随后的纤维化。Hattori 等<sup>[6]</sup>对 PAI-1 缺陷的小鼠用凝血酸(纤溶酶的抑制剂)预处理后,发现 BLM 诱导的 PF 与野生型小鼠的程度相似,但两者 BALF 中的白细胞的数目和种类差不多,进一步验证了 PAI-1 主要是通过干预纤溶酶的活性而促进 PF。

水蛭是一味传统的中药,属于高度特化的环节动物,俗称蚂蟥。中医认为水蛭有破血、逐瘀、通经、利水道之功效,现代中医以水蛭的破血、逐瘀为纲,使用单味水蛭或复方,用其煎剂、片剂、口服液等剂型,通过口服、外敷、和局部注射等途径给药,治疗不同系统、部位的血瘀症,适应症涉及心脑血管、肝、肾、血液等疾病以及外伤疼痛、癌症等,Haycraft<sup>[7]</sup>通过试验证明水蛭水提取物具有抗凝血作用。水蛭水提取液在体外有强的抗凝血作用,能显著延长纤维蛋白原的凝聚时间<sup>[8]</sup>;水蛭水提取液对 ADP 诱导的大鼠血小板聚集有显著抑制作用,能明显抑制正常人的血小板聚集,降低全血比黏度

和血浆比黏度,使红细胞电泳时间缩短。水蛭抗凝作用的发挥主要依赖于其中的活性成分—水蛭素。水蛭素是凝血酶特异抑制剂,能与凝血酶形成极稳定的复合物,而且反应速度极快,使凝血酶失去裂解纤维蛋白的能力,同时阻止凝血酶催化凝血因子的活化<sup>[9]</sup>,阻止凝血酶同血小板结合以及引起血小板的聚集、释放反应,从而阻止血液凝固<sup>[10]</sup>。除此之外,水蛭素还能抑制凝血酶诱导的平滑肌细胞迁移和成纤维细胞增殖,抑制凝血酶对内皮细胞的刺激反应<sup>[11]</sup>。有研究发现,水蛭素能显著下调凝血酶介导的肾小球系膜细胞 PAI-1 mRNA 的表达,采用水蛭素等进行抗凝血和抗纤维蛋白沉积,还可拮抗凝血酶介导的 ECM 合成与降解的失衡<sup>[12]</sup>。凝血酶通过凝血酶受体-1 (PAR-1) 的蛋白水解作用诱导人肺成纤维细胞产生结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)<sup>[13]</sup>。CTGF 能促使成纤维细胞有丝分裂,是胶原蛋白和纤维连接蛋白产生的化学诱导剂和启动因子。对新生的小鼠重复皮下注射 CTGF 可导致结缔组织沉积,证实了 CTGF 对组织修复和纤维化形成起重要的作用<sup>[14]</sup>。

HYP 是机体胶原蛋白的主要成分之一,不同组织中的 HYP 含量可作为衡量胶原组织代谢的重要指标。本研究中,HD 组 HYP 明显低于 MD 组,表明水蛭对博来霉素诱导的肺纤维化大鼠具有一定的保护作用。本研究中 MD 组 PAI-1 含量及活性明显高于 HD 组,NC 组 PAI-1 明显低于其它各组,提示肺纤维化大鼠机体中凝血及抗凝系统的动态平衡被打破,给予水蛭干预后,PAI-1 含量及活性明显降低,推测水蛭可通过影响肺纤溶活性而影响胶原代谢,其机理可能是水蛭通过减少凝血酶在肺内的表达,降低 PAI-1 含量及活性,达到减少纤维蛋白沉积和加速胶原降解的作用,其确切作用机制尚需进一步研究。

## 4 参考文献

- [1] Dawes KE, Gray AJ, Laurent GJ. Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication[J]. *Eur J Cell Sci*, 2003(61):126-130.
  - [2] Chambers RC, Dabbagh K, McNulty RJ. Thrombin stimulates fibroblast pro-collagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1[J]. *Biochem J*, 2002(333):121-127.
  - [3] 李岩,陈香美,张颖,等. 药海乐得对部分肾切除大鼠参与肾组织表达 TGF- $\beta$ 1 及 PAI-1 mRNA 的影响[J]. *中国病理生理学杂志*, 1999(15):594-597.
  - [4] Hackett SF. Thrombin is a stimulator of retinal pigment epithelial cell proliferation[J]. *Exp Eye Res*, 2005(1):95-100.
  - [5] Dawes KE, Gray AJ, Laurent GJ. Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication[J]. *Eur J Cell Sci*, 2006(61):126-130.
  - [6] Hattori N, Degen JL, Sisson TH, et al. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice[J]. *J Clin Invest*, 2000(11):1341-1350.
  - [7] Haycraft JB. Über die einwirkung eines sekretes des officineller Blutegels auf die gerinnbarkeit des bluts[J]. *N. S. Arch Exp Pathol Pharmacol*, 2004(18):209.
  - [8] 欧兴长. 100 多种中药和复方抗凝血酶作用的试验观察[J]. *中西医结合杂志*, 1988(2):102.
  - [9] Markwardt F. Development of hirudin as an antithrombotic agent[J]. *Semin Thromb Hemostasis*, 2001(15):269.
  - [10] Badimon L. Thrombin regulation of platelet interaction with damaged vessel wall and isolated collagen type I at arterial flow conditions in a porcine model: effects of hirudins, heparin, and calcium chelation[J]. *Blood*, 2002(2):423-34.
  - [11] Hackett SF. Thrombin is a stimulator of retinal pigment epithelial cell proliferation[J]. *Exp Eye Res*, 2005(1):95-100.
  - [12] 何庆南. 凝血酶诱导人胚胎肾系膜细胞增殖和表达的研究[J]. *湖南医科大学学报*, 2000(2):191-193.
  - [13] Chambers R, Leoni P, Blanc-Brude O. Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1[J]. *J Biol Chem*, 2000(275):35584-35591.
  - [14] David L J. Howell, Richard P Marshall, Richard Starke. The role of thrombin in the pathogenesis of pulmonary fibrosis[J]. *American Journal of Pathology*, 2001(159):1383-1395.
- (2011-12-23 收稿, 2012-02-28 修回)  
编辑:潘 娅