

白藜芦醇调控刺猬信号对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响

白永恒¹, 梁 勇¹, 史 波¹, 陆 红², 吴存造³, 林成成¹, 洪炜龙¹, 陈必成¹

(温州医科大学附属第一医院 1. 外科实验室, 2. 医学检验中心, 3. 移植科, 浙江 温州 325000)

摘要: **目的** 探讨白藜芦醇(Res)减轻输尿管梗阻诱导大鼠肾间质纤维化(RIF)的分子机制。**方法** 将 48 只 SD 大鼠随机分为假手术组($n=16$)、单侧输尿管梗阻(UUO)模型组($n=16$)和模型+Res 组($n=16$)。模型+Res 组于手术当天 ig 给予 Res $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 每天 1 次, 分别于梗阻术后第 7 和 14 天取其梗阻侧肾组织, 用 HE 和 Masson 染色观察肾小管上皮细胞形态变化和 RIF 程度; ELISA 检测肾组织中刺猬信号起始蛋白刺猬蛋白(SHH)含量; 免疫组织化学染色检测 SHH, smoothened(Smo), patched-1(Ptch1)和 Gli1、增殖细胞核抗原(PCNA)以及细胞外基质(ECM)成分Ⅲ型胶原蛋白表达; 实时荧光定量 PCR 技术检测 Smo, Ptch1 和 Gli1 mRNA 的表达。**结果** HE 和 Masson 染色显示, UUO 模型大鼠术后 RIF 程度随着梗阻时间延长而加重, Res 治疗能减轻上述纤维化病变; 免疫组织化学染色结果显示, 与假手术组比较, UUO 模型大鼠肾组织Ⅲ型胶原的表达显著升高($P<0.05$), 并且与细胞增殖相关的 PCNA 也明显高表达($P<0.05$); Res 治疗后Ⅲ型胶原和 PCNA 表达水平降低($P<0.05$); UUO 模型大鼠肾组织 SHH, Smo 和 Gli1 表达升高($P<0.05$), Ptch1 表达降低($P<0.05$), 且均可被 Res 逆转($P<0.05$)。**结论** Res 可有效缓解输尿管梗阻所致的 RIF, 其机制可能为 Res 下调 SHH 信号活性, 抑制细胞增殖, 阻碍 ECM 成分合成, 进而减轻其在肾间质的累积而改善纤维化。

关键词: 白藜芦醇; 刺猬蛋白类; 输尿管梗阻; 间质组织; 纤维化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2014)05-0718-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2014.05.006

控制慢性肾病发生发展的关键是控制肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)的进程, 有效的防治 RIF 可延缓终末期肾病的进程, 从而延长患者寿命。本研究集体已研究证实, 输尿管梗阻诱导大鼠 RIF 或者马兜铃酸损伤肾小管上皮细胞诱导胶原累积过程中, 刺猬信号(sonic hedgehog, SHH)均被激活^[1-2]。活化的 SHH 信号可提高转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)的表达, 促进小管上皮细胞向间质细胞转化, 最终导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在间质的广泛累积而引起 RIF。因此, 阐明 RIF 中 SHH 信号转导机制, 开发调控该信号的相关药物, 对于治疗 RIF 具有十分重要的临床意义。最近研究显示, 从红葡萄酒中提炼出来的一种多酚类化合物白藜芦醇

(resveratrol, Res)具有抑制 SHH 信号的生物活性^[3]。因此, 推测 Res 可通过调控 SHH 信号通路, 进而缓解 RIF。为此, 本研究通过建立单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)大鼠肾纤维化模型, 观察 Res 对 SHH 信号和 ECM 累积的影响, 探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

48 只雄性 SD 大鼠(体质量 180~200 g)购于温州医科大学实验动物中心, 动物许可证号 SCXK(沪)2010-0002, 饲养于 SPF 级环境, 给予标准的饮食和饮水, 于实验前 12 d 开始禁食。

1.2 主要试剂和仪器

Res 购自上海源叶生物公司; HE 染色试剂盒购自碧云天公司; Masson 试剂盒购自 Solarbio 公司; 免疫组织化学试剂盒购自中杉金桥公司; 兔抗鼠 SHH, patched-1(Ptch1), Gli1 和 smoothened(Smo)抗体购自美国 Santa Cruz 公司; Ⅲ型胶原和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体购自中国 Bioworld 公司; Trizol

基金项目: 浙江省自然科学基金(LQ12H05001); 浙江省自然科学基金(LY12H05004); 温州市科技计划项目(Y20110028); 温州市科技计划项目(Y20130158)

作者简介: 白永恒(1979-), 男, 主管技师, 主要从事组织纤维化研究。

通讯作者: 陈必成, Tel: (0577) 88069338, E-mail: greatsailor@163.com

试剂购自美国 Invitrogen 公司;RNA 逆转录试剂盒购自日本 Toyobo 公司;ABC-ELISA 试剂盒购自上海西唐生物。MyCycler 梯度 PCR 仪,美国 Bio-Rod 公司;7500 定量 PCR 仪,美国 Applied Biosystems公司;Varioskan Flash 全波长多功能扫描仪,美国 Thermo Scientific 公司;DM4000 B LED 荧光正置显微镜,德国 Leica 公司。

1.3 动物分组和模型制备

将大鼠随机分为假手术组 ($n=16$),UUO 模型组 ($n=16$) 和 UUO 模型+Res 组 ($n=16$)。UUO 和 UUO 模型+Res 组进行左侧输尿管结扎,假手术组开腹后游离左侧输尿管不予结扎。UUO 模型标准化关键在于无菌操作和结扎于输尿管上 1/3 处。UUO 模型+Res 组从手术当天起连续 ig 给予 Res $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每天 1 次,UUO 模型组和假手术组 ig 给予生理盐水,于术后第 7 和 14 天取梗阻侧肾组织用于指标检测。对于正常成人(体质量 70 kg) Res 每日的建议用量为 200 mg,换算成大鼠(体质量 200 g)的实际用量为每天 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

1.4 HE 染色观察肾组织病理变化

梗阻侧肾取出后,进行纵轴和横轴测量。横截面切割切开后加入 4%多聚甲醛固定,按常规方法进行组织脱水、透明、浸蜡和包埋。切成约 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚的切片,经脱蜡、梯度乙醇和 HE 染色,中性树胶封片。通过显微镜观察肾组织切片,对肾小管间质损伤程度进行评分^[4]。

1.5 Masson 染色观察肾组织纤维化

石蜡切片脱蜡后,按试剂盒说明书操作。苏木素-三氯化铁染核 10 min;盐酸乙醇分化、水洗;氨水反蓝,水洗;丽春红酸性染液染色 10 min,醋酸洗 1 min;1%磷钼酸作用 2 min,直接用苯胺蓝染色 2 min;直接 95%乙醇分化 30 s;脱水、透明、封片、

镜检。Masson 染色后肌纤维为红色,胶原纤维呈蓝色。评分标准参照文献^[4]。

1.6 免疫组织化学染色检测 SHH 信号分子和Ⅲ型胶原的表达

用免疫组织化学链霉抗生物素蛋白连接的过氧化物酶法。标本用 4%多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋后连续切片,厚 $4\text{ }\mu\text{m}$ 。柠檬酸盐微波辐射进行抗原修复,二氨基联苯胺显色后经苏木精复染。以一抗稀释液代替一抗作为阴性对照,细胞核、细胞浆或胞膜出现棕黄色颗粒为阳性表达。光镜下每张切片随机选取 10 个高倍视野 ($\times 200$),应用 Image-Pro Plus 6.0 软件,测每个视野下阳性表达区域的平均光密度值(累积光密度/分析面积)。

1.7 实时荧光定量 RT-PCR 检测 SHH 信号分子和 ECM 相关基因 mRNA 的表达

应用 Primer 5.0 软件设计 SHH 信号通路分子 Smo, Ptch1 和 Gli1 特异性引物,以及 β 肌动蛋白引物,引物序列如表 1 所示,由上海生工公司合成。将大鼠新鲜肾组织置于液氮中保存。采用 Trizol 试剂提取大鼠肾组织 RNA,并于 260/280 nm 测定吸光度(A)值,分析 RNA 纯度和浓度,将 RNA 逆转录成 cDNA。实时 RT-PCR 程序为 95°C 3 min 预变性,1 个循环; 95°C 5 s,60 或 62°C 35 s,40 个循环。同时采用溶解曲线分析以评价 PCR 结果的可靠性。采用相对定量法计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$,表示待测基因相对表达水平。

1.8 ELISA 检测肾组织 SHH 含量

取 200 mg 组织,用 2 mL 的 PBS 进行匀浆溶解,通过离心分离出上清液,制成 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白原液,根据试剂盒说明书采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测 SHH 含量,450 nm 处测 A 值,通过绘制标准曲线求出浓度。

Tab.1 Specific mRNA primers for sonic hedgehog (SHH) signaling-related genes

Gene	Sequence (5'→3')	GenBank	Length/bp
Gli1	CCTCGTGGCTTTCATCAACTCT (F)	XM_002729800.1	185
	GAAGCATCATTGAACCCTGAGTAGA (R)		
Ptch1	TCCAGCCGACCCAGATTG (F)	NM_053566.1	252
	ACATAGTCGTAGCCCCTGAAGTG (R)		
Smo	TGTGGCTCAGGTAGATGG (F)	NM_012807.1	170
	GGTGGTTGCTCTTGATGG (R)		
β -Actin	CCCATCTATGAGGGTTACGC (F)	NM_031144.2	150
	TTTAATGTCACGCACGATTTTC (R)		

Ptch1: patched 1; Smo: smoothened.

1.9 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件包进行统计学分析,两样本比较采用 t 检验和精确概率法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Res 对 UUO 大鼠肾组织病理变化的影响

HE 染色结果(图 1)表明,假手术组 7 和 14 d(图 1A1 和 A2)大鼠肾组织结构均正常,小管排列紧密、整齐,小管基底膜连续,间质区无炎症细胞浸润;与假手术组比较,UUO 模型组 7 和 14 d(图 1B1 和 B2)肾小管明显扩张,间质区面积增大($P < 0.01$);与模型组比较,UUO 模型+Res 组(图 1C1 和 C2)梗阻肾间质炎症细胞浸润较少,小管扩张较轻($P < 0.05, P < 0.01$)。

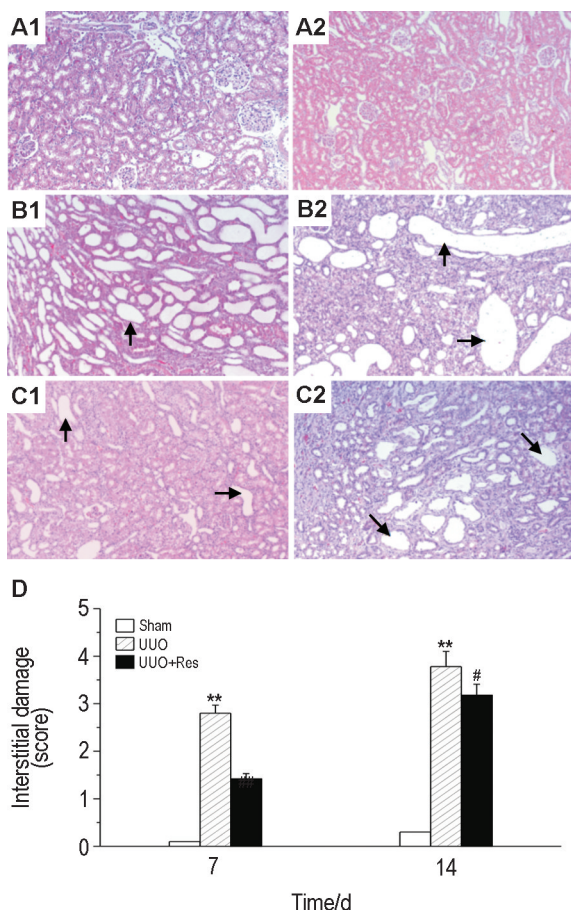


Fig.1 Effect of resveratrol (Res) on renal pathological changes of unilateral ureteral obstruction (UUO) model rats (HE staining, $\times 100$). The rats underwent UUO surgery and postoperatively received daily intragastric administration consecutively for 7 or 14 d with either normal saline or Res $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The kidneys were excised on the 7th and 14th day and tubulointerstitial damage was graded as described^[4]. 1: 7 d; 2: 14 d; A: sham; B: UUO model; C: UUO+Res $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; D: semi-quantitative results of scores for interstitial damage. The arrows show tubulointerstitial damage. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. ** $P < 0.01$, compared with sham group; # $P < 0.05$, # $P < 0.05$, compared with UUO model group.

Masson 染色结果(图 2)表明,假手术组 7 和 14 d(图 2A1 和 A2)肾间质无明显胶原累积;与假手术组比较,UUO 模型组 7 和 14 d(图 2B1 和 B2)大鼠肾间质胶原相对面积增大,胶原纤维增多($P < 0.01$);与模型组比较,UUO 模型+Res 组(图 2C1 和 C2)间质胶原相对面积增加不明显,只有少量胶原纤维累积($P < 0.05$)。

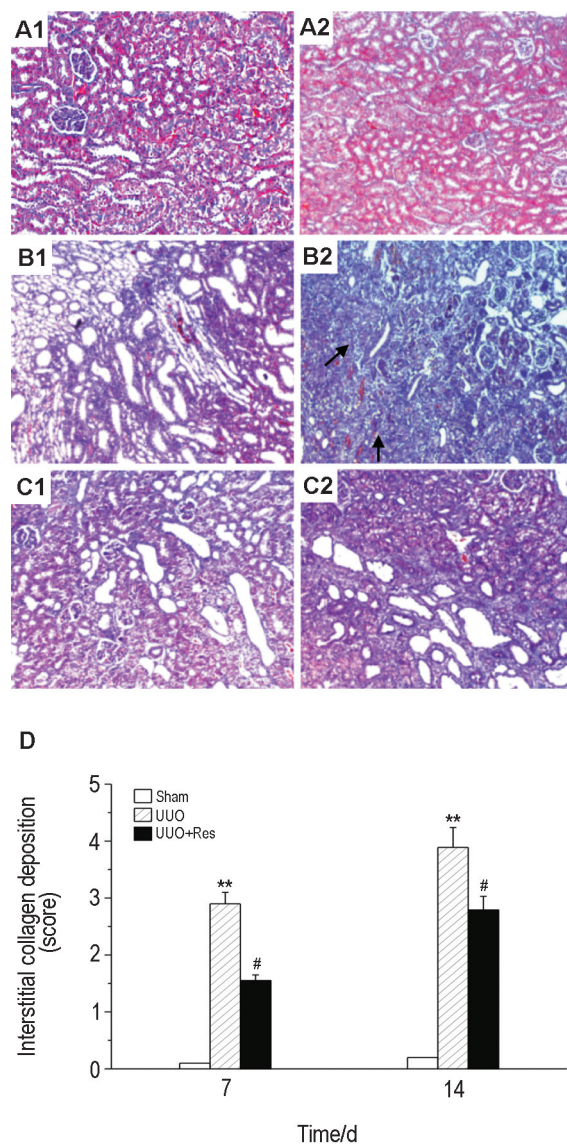


Fig.2 Effect of Res on collagen deposition in kidney tissue of UUO model rats (Masson staining, $\times 100$). See Fig.1 for the rat treatment. The degree of interstitial collagen deposition was graded^[4]. 1: 7 d; 2: 14 d; A: sham; B: UUO model; C: UUO+Res $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; D: semi-quantitative results of scores for interstitial damage. The arrows show interstitial collagen deposition. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. ** $P < 0.01$, compared with sham group; # $P < 0.01$, compared with UUO group.

2.2 Res 对 UUO 大鼠肾组织 ECM 成分累积的影响

免疫组化结果(图 3)显示,假手术组 7 和 14 d(图 3A1 和 A2)大鼠肾间质 III 型胶原表达较低;与

假手术组相比, UUO 模型组 7 和 14 d (图 3B1 和 B2) 输尿管梗阻所致肾间质中 III 型胶原表达明显升高 ($P<0.05$), 14 d 组更加明显; Res 给药 7 和 14 d (图 3C1 和 C2), 可显著降低梗阻所致 III 型胶原蛋白表达 ($P<0.05$)。

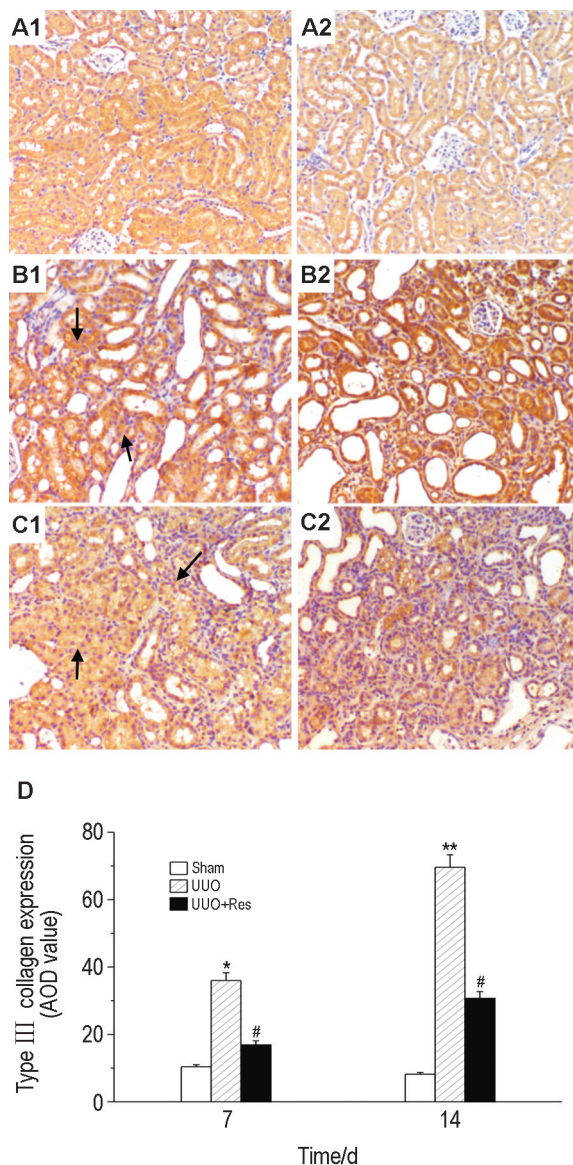


Fig.3 Effect of Res on expression of type III collagen in kidney tissue of UUO model rats (immunohistochemical staining, $\times 200$). See Fig.1 for the rat treatment. 1: 7 d; 2: 14 d; A: sham; B: UUO model; C: UUO+Res $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; D: semi-quantitative results of type III collagen; the average optical density (AOD) value of positive expression under each view (accumulated light density/analysis area). The arrows show type III collagen expression. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with sham group; # $P<0.05$, compared with UUO group.

2.3 Res 对 UUO 大鼠肾组织 PCNA 表达的影响

免疫组化 (图 4) 结果显示, 假手术组 7 和 14 d (图 4A1 和 A2) 大鼠肾组织 PCNA 表达阳性细胞数 (箭头所示) 较少; UUO 模型组 7 和 14 d (图 4B1

和 B2) 肾组织 PCNA 表达阳性细胞数明显增加 ($P<0.01$); Res 治疗 7 和 14 d 组 (图 4C1 和 C2) PCNA 阳性细胞明显减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

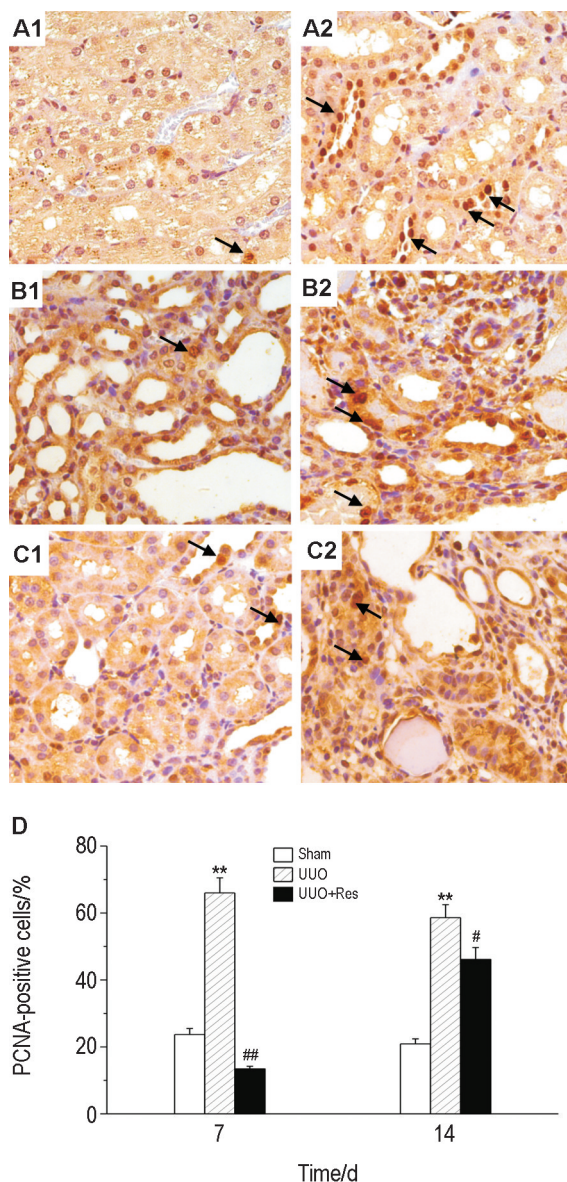


Fig.4 Effect of Res on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in kidney tissue of UUO model rats (immunohistochemical staining, $\times 400$). See Fig.1 for the rat treatment. 1: 7 d; 2: 14 d; A: sham; B: UUO model; C: UUO+Res $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; D: the percentage of PCNA-positive cells. The arrows show PCNA-positive cells. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. ** $P<0.01$, compared with sham group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with UUO group.

2.4 Res 对 UUO 大鼠肾组织中 SHH 信号通路的影响

ELISA 结果 (表 2) 表明, Res 治疗 7 和 14 d 可降低 UUO 大鼠肾组织 SHH 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$); 免疫组织化学染色 (图 5) 和实时定量 RT-PCR 结果 (表 3) 表明, Res 治疗 7 和 14 d 可降低 UUO 大鼠肾组织 SHH, Smo 和 Gli1 mRNA 和蛋白水平 ($P<0.05$), 增加 Ptch1 mRNA 和蛋白表

达水平 ($P<0.05$, $P<0.01$), 提示 Res 对输尿管梗阻所致 RIF 的保护作用可通过抑制 SHH 信号活化实现。

Tab.2 Effect of Res on sonic hedgehog (SHH) expression in kidney tissue of UUO model rats

Group	SHH/ $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ tissue	
	7	14(d)
Sham	1915±111	2133±104
UUO	3799±308 [*]	7899±482 ^{**}
UUO+Res	1699±99 [#]	1951±127 ^{##}

See Fig. 1 for the rat treatment. SHH levels were detected by ELISA. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, compared with sham group; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, compared with UUO group.

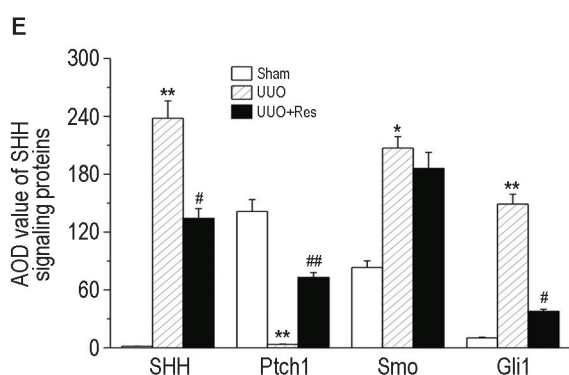
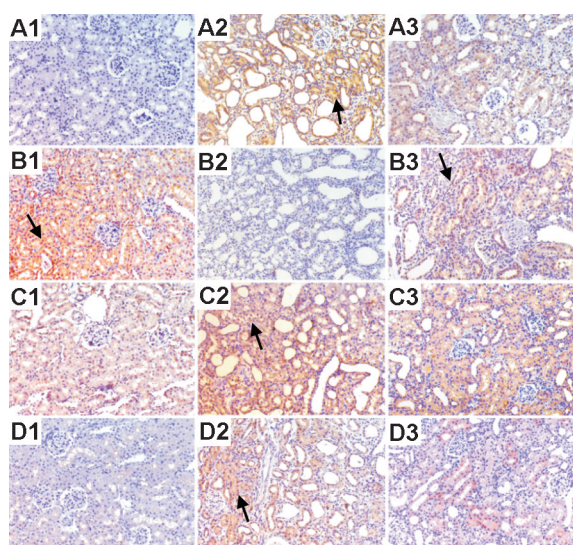


Fig.5 Effect of Res on SHH signaling proteins in kidney tissue of UUO model rats (immunohistochemical staining, $\times 200$). See Fig.1 for the rat treatment. 1: sham; 2: UUO 7 d; 3: UUO+Res 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 7 d; A: SHH; B: Ptch1; C: Smo; D: Gli1; E: semi-quantitative results of SHH-related proteins. The average optical density (AOD) value of positive expression under each view (accumulated light density/analysis area). The arrows show target protein positive expression. $\bar{x} \pm s$, $n=8$. ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, compared with sham group; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, compared with UUO group.

Tab.3 Effect of Res on expression of SHH signaling-related genes in kidney tissue of UUO model rats

Group	Target gene expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
	7 d		
	Ptch1	Smo	Gli1
Sham	1.03±0.05	0.99±0.07	1.06±0.13
UUO	0.38±0.02 [*]	1.35±0.10 [*]	3.81±0.20 [*]
UUO+Res	0.53±0.04 [#]	1.05±0.06 [#]	1.90±0.90 [#]

Group	14 d		
	Ptch1	Smo	Gli1
Sham	1.01±0.07	0.98±0.07	0.99±0.08
UUO	0.12±0.01 ^{**}	2.41±0.21 [*]	3.44±0.19 [*]
UUO+Res	0.35±0.01 [#]	1.47±0.11 [#]	2.22±0.15 [#]

See Fig.1 for the rat treatment. The mRNA expression of SHH signaling-related genes was detected by real-time RT-PCR. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, compared with sham group; [#] $P<0.05$, compared with UUO group.

3 讨论

SHH 信号主要由 SHH 配体、膜受体 Ptch1、Smo 及下游的转录因子 Gli 组成。当存在 SHH 蛋白时,SHH 与 Ptch1 结合,解除对 Smo 的抑制效应,进而激活下游的 Gli,引发级联效应,此为经典的 SHH 信号活化方式。活化的 SHH 信号可调控 Ptch1、c-Myc 和细胞周期蛋白 D1 等与增殖相关的靶基因表达^[5]。因此,SHH 信号与肿瘤等增殖性疾病的发生发展关系密切。

本研究结果显示,输尿管梗阻后,肾组织中 PCNA 阳性细胞在所有细胞中的比率明显升高,尤其是梗阻后 7 d 时,肾小管周围的上皮细胞以及间质区域的细胞增殖异常明显。对于肾小管上皮细胞而言,其受到损伤引起凋亡的同时,会出现反馈性增殖并可能发生表型转化,形成产生胶原纤维的肌成纤维细胞。而间质区域的成纤维细胞是胶原纤维的合成工厂,其过度增殖是推动 RIF 的主要原因。纤维化过程中,细胞的这种反应可能与增殖相关的 SHH 信号异常激活有关。国内外学者发现,肝、胆等多种组织的纤维化发生时,SHH 信号均存在不同程度的活化^[6-7]。应用 Smo 蛋白特异性拮抗剂环靶明进行治疗,可有效抑制 SHH 信号的活化,阻断肝星状细胞或胆管上皮细胞增殖、促进其凋亡,进而抑制肝、胆纤维化的形成。本研究通过输尿管梗阻诱导大鼠 RIF 观察到 SHH 信号的活化。因此,寻找 SHH 信号相关的调控药物,可为 RIF 的治疗提供新的希望。

Res 是最新发现的、具有调控 SHH 信号通路活性的一类多酚类化合物^[3]。Res 又称为芪三酚,主要来源于葡萄(红葡萄酒)、虎杖、花生和桑葚等植物。Res 是一种天然的抗氧化剂,具有抗癌、降低血小板聚集、预防和治疗动脉粥样硬化等作用。本研究结果表明,Res 可下调 III 型胶原的表达,抑制其在肾间质的累积,进而缓解 RIF 进程。因此,Res 具有抗肾纤维化作用。以前研究显示,Res 可通过抑制 SHH 信号的活化,抑制胰腺癌细胞增殖,诱导其凋亡,进而发挥抗肿瘤作用^[8]。Res 也可抑制白细胞介素 6 介导的 SHH 信号活化,抑制肿瘤干细胞增殖,进而发挥抗急性髓性白血病作用^[9]。此外,Res 可通过调控 SHH 信号以调节骨髓间充质细胞的分化^[10]。因此,Res 对于 SHH 信号转导的调控具有十分重要的作用。本研究观察到 Res 下调纤维化肾组织中 SHH, Smo 和 Gli1 的表达,增加了 Ptch1 的表达,说明输尿管梗阻引起 RIF 过程中,SHH 信号的活化也可被 Res 抑制。在纤维化发生过程中,活化的 SHH 参与了多种间质细胞的增殖。在 UUO 大鼠肾组织中,细胞增殖关键蛋白 PCNA 的表达较高,而 Res 治疗后 PCNA 表达明显降低。这种表达改变可能是 III 型胶原等 ECM 成分减少的原因之一。

综上所述,Res 可以缓解由于输尿管梗阻导致的 RIF。结合前期研究结论,认为 Res 抗 RIF 作用通过抑制 SHH 信号的活化,进而抑制 ECM 成分在肾间质广泛的累积来实现。然而,Res 对 SHH 信号的调控方式及作用靶点目前均不清楚。因此,进一步明确 Res 和 SHH 信号的关系,并深入探讨其与 TGF- β_1 和小管上皮细胞的表型转化等关系具有重要意义。

参考文献:

- [1] Bai YH, Lu H, Zhou Q, Lin CC, Liang Y, Hong WL, *et al.* Expression of sonic hedgehog pathway-related genes in kidney tissues of rats with unilateral ureteral obstruction[J]. *Chin J Pathophysiol*(中国病理生理杂志), 2012, **28**(12):2227-2232.
- [2] Bai YH, Hong WL, Liu B, Lu H, Lin CC, Xia P, *et al.* Sonic hedgehog signaling is involved in aristolochic acid-induced renal tubular epithelial cells injury *in vitro*[J]. *Chin J Nephrol*(中华肾脏病杂志), 2013, **29**(4):288-292.
- [3] Slusarz A, Shenouda NS, Sakla MS, Drenkhahn SK, Narula AS, MacDonald RS, *et al.* Common botanical compounds inhibit the hedgehog signaling pathway in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, **70**(8):3382-3390.
- [4] Lin SL, Chen RH, Chen YM, Chiang WC, Lai CF, Wu KD, *et al.* Pentoxifylline attenuates tubulointerstitial fibrosis by blocking Smad3/4-activated transcription and profibrogenic effects of connective tissue growth factor[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, **16**(9):2702-2713.
- [5] Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers [J]. *Science*, 2004, **304**(5678):1755-1759.
- [6] Choi SS, Omenetti A, Witek RP, Moylan CA, Syn WK, Jung Y, *et al.* Hedgehog pathway activation and epithelial-to-mesenchymal transitions during myofibroblastic transformation of rat hepatic cells in culture and cirrhosis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, **297**(6):G1093-G1106.
- [7] Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, *et al.* Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans[J]. *J Clin Invest*, 2008, **118**(10):3331-3342.
- [8] Mo W, Xu X, Xu L, Wang F, Ke A, Wang X, *et al.* Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis through the hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cell [J]. *Pancreatology*, 2011, **11**(6):601-609.
- [9] Su YC, Li SC, Wu YC, Wang LM, Chao KS, Liao HF. Resveratrol downregulates interleukin-6-stimulated sonic hedgehog signaling in human acute myeloid leukemia [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, **2013**:547430.
- [10] Huang JG, Shen CB, Wu WB, Ren JW, Xu L, Liu S, *et al.* Primary cilia mediate sonic hedgehog signaling to regulate neuronal-like differentiation of bone mesenchymal stem cells for resveratrol induction *in vitro*[J]. *J Neurosci Res*, 2014, **92**(5):587-596.

Resveratrol attenuates renal interstitial fibrosis by inhibiting activation of sonic hedgehog signaling in rats with unilateral ureteral obstruction

BAI Yong-heng¹, LIANG Yong¹, SHI Bo¹, LU Hong², WU Cun-zao³, LIN Cheng-cheng¹,
HONG Wei-long¹, CHEN Bi-cheng¹

(1. Key Laboratory of Surgery, 2. Department of Laboratory Medicine, 3. Department of Transplantation,
the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the molecular mechanisms of resveratrol (Res) in renal interstitial fibrosis (RIF) in rats with unilateral ureteral obstruction (UUO). **METHODS** Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly divided into UUO (normal saline, $n = 16$), UUO with Res treatment (Res, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 16$), and sham-operation (sham, $n = 16$) models. The kidneys were excised on the 7th and 14th day. The deposition of collagen fiber in the kidney was detected with HE and Masson staining. The levels of sonic hedgehog (SHH, an inducer of SHH pathway) in kidney tissues were determined by ELISA. Immunohistochemical analysis was performed to evaluate the protein expression of SHH signaling-related molecules, including SHH, smoothened (Smo), patched-1 (Ptch1), and Gli1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and matrix component type III collagen. The mRNA expression levels of Smo, Ptch1 and Gli1 were detected by real-time RT-PCR. **RESULTS** The degree of RIF observed with HE and Masson staining was obviously increased in UUO kidneys, but decreased in Res-treated kidneys. Enhanced expression levels of type III collagen and PCNA in UUO rats were suppressed by Res treatment ($P < 0.05$). Res administration decreased the expression levels of SHH, Smo, and Gli1 ($P < 0.05$), but increased the expression of Ptch1 ($P < 0.05$), suggesting that Res inhibit the obstruction-induced activation of SHH signaling. **CONCLUSION** Res can attenuate RIF in UUO rats, and the possible mechanism is that Res down-regulates the activity of SHH signaling and inhibits cellular proliferation, resulting in inhibition of matrix accumulation in renal interstitium of UUO rats.

Key words: resveratrol; Hedgehog proteins; ureteral obstruction; interstitial tissue; fibrosis

Foundation item: The project supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ12H05001); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY12H05004); Wenzhou Municipal Science and Technology Plan Project (Y20110028); and Wenzhou Municipal Science and Technology Plan Project (Y20130158)

Corresponding author: CHEN Bi-cheng, Tel: (0577) 88069338, E-mail: greatsailor@163.com

(收稿日期: 2014-01-18 接受日期: 2014-09-16)

(本文编辑: 齐春会)