

增殖细胞核抗原在原发性肾病综合征患儿肾组织的表达

马祖祥¹, 赵维玲¹, 何小解², 易著文²

(1. 深圳市儿童医院 内科 广东 深圳 518026 2. 中南大学湘雅二医院 儿科 湖南 长沙 410011)

[摘要]目的 探讨肾病综合征(NS)患儿肾组织增殖细胞核抗原(PCNA)的表达水平及其与肾脏固有细胞增生间的关系。方法 以39例原发性NS患儿肾活检石蜡包埋肾组织及6例肾肿瘤肾切除患者正常肾组织为研究对象,用免疫组织化学方法检测PCNA在肾组织的表达水平,并与NS患儿的病理类型、肾组织病理学积分及肾活检的临床参数进行比较。结果 NS组肾小球和肾小管-间质内PCNA阳性细胞百分率均明显高于对照组,且不同病理类型NS患儿的肾小球内PCNA阳性细胞百分率存在显著差异。肾小球和肾小管-间质内PCNA阳性细胞百分率分别与肾小球和肾小管-间质的病理积分呈正相关,肾小球内PCNA阳性细胞百分率与血清胆固醇呈正相关,肾小管-间质内PCNA阳性细胞百分率与24h尿蛋白量呈正相关。结论 NS患儿肾组织PCNA表达水平增加促进肾脏固有细胞的异常增生,PCNA是判断原发性NS肾脏组织损伤程度和预后的敏感指标。

实用儿科临床杂志 2004 19(5) 369-371

[关键词] 肾病变综合征 增殖细胞核抗原 细胞增殖

[中图分类号] R725.7 [文献标识码] A [文章编号] 1003-515X(2004)05-0369-03

Expression of proliferating cell nuclear antigen in renal tissues of children with primary nephrotic syndrome

MA Zu-xiang¹, ZHAO Wei-ling¹, HE Xiao-jie², YI Zhu-wen²

(1. Department of Nephrology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, China 2. Department of Pediatrics, the Second Xiangya Hospital, Zhongnan University, Changsha 410011, China)

Abstract : Objective To investigate the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in renal tissues of children with primary nephrotic syndrome (NS) and elucidate the relationship between PCNA expression and cell proliferation in renal tissues from the children with primary NS. **Methods** Paraffin-embedded renal biopsy tissue sections from 39 patients with primary NS were examined by immunohistochemical staining with anti-PCNA monoclonal antibody, normal renal tissue sections from 6 nephrectomized patients with nephroma were selected as control. Possible correlation between the percentage of PCNA positive cells and the pathologic type, histopathological score, clinical indices (serum albumin, serum cholesterol, serum creatinine and 24 hours urine protein) before renal biopsy of NS were evaluated separately. **Results**

The percentage of PCNA positive cells in glomeruli and tubulointerstitium of NS patients was significantly higher than that of the control ($P < 0.05$); The percentage of PCNA positive cells in glomeruli or tubulointerstitium of NS patients was positively correlated with the histopathological score of glomeruli or tubulointerstitium separately, the correlation coefficient were 0.748 ($P < 0.001$) and 0.650 ($P < 0.01$); the percentage of PCNA positive cells in glomeruli was positively correlated with the serum cholesterol level of NS patients before biopsy, the correlation coefficient was 0.571 ($P < 0.05$); the percentage of PCNA positive cells in tubulointerstitium was positively correlated with the amount of 24 hours urine protein of NS patients before biopsy, the correlation coefficient was 0.662 ($P < 0.05$). **Conclusions** The overexpression of PCNA in renal tissues from the children with primary NS can enhance cell proliferation in renal tissues, and PCNA is a sensitive index in judging the pathological injury degree and prognosis of primary NS.

J Appl Clin Pediatr 2004 19(5) 369-371

Key words : nephrotic syndrome; proliferating cell nuclear antigen; cell proliferation

儿童肾小球疾病的慢性进展是成年期慢性肾功能不全的主要原因,而肾脏固有细胞的增殖及伴随细胞外基质的积累是肾小球硬化发展的病理基础^[1],细胞增殖又受细胞周期调控物质的调节。本文采用免疫组织化学技术观察细胞周期蛋白(cyclin)增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear anti-

gen, PCNA)在原发性肾病综合征(NS)患儿肾组织的表达情况及其与原发NS患儿临床参数、病理类型和肾组织增生程度的关系,以进一步阐明肾小球增生、硬化的机制。

对象和方法

一、对象 实验组为1997年8月~2001年11月在我院儿科进行肾活检的39例原发性NS患儿的石蜡包埋肾组织,均符合中华医学会儿科学分会肾脏病学组制定《小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗》^[2],其中男23例,女16例;年

[收稿日期] 2003-12-25

[作者简介] 马祖祥(1973-),男,主治医师,博士学位,研究方向为肾脏疾病。万方数据

龄 2.25 ~ 14 岁 ; 从起病到肾活检为 4.5 ~ 49 个月。病理诊断及分型标准依据 1986 年中华肾脏病学会肾脏病理协助组制订标准^[3] , 其中微小病变型 8 例 , 局灶节段性肾小球硬化 9 例 , 系膜增生性肾小球肾炎 15 例 , 膜增生性肾小球肾炎 7 例。对照组为 2001 年 10 ~ 12 月我院泌尿外科住院 6 例肾肿瘤并行肾切除患者肾组织 , 其血压正常 , 血、尿常规和肝肾功能检查正常 , 选取远离肿瘤部位肾组织 , 肉眼和光镜观察组织结构正常。

二、方法 1. 回顾全部病例的病史、肾活检前的实验室检查结果 : 尿常规、24 h 尿蛋白定量、肝功能、肾功能和血脂。2. 免疫组织化学 (免疫组化) 染色 : 将石蜡包埋肾组织按常规进行切片、制片、二甲苯和梯度酒精脱蜡至水后采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (streptavidin-biotin complex, SABC) 法进行免疫组织化学染色 , 具体操作过程按说明书进行 , 同时以磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作为阳性对照。小鼠抗-PCNA 单克隆抗体及 SABC 免疫组织化学试剂盒均为武汉博士德生物工程有限公司产品。3. 实验结果在显微镜下观察 , 每个标本分别选取肾小球和肾小管-间质两部位分别进行计数 , 每个部位计数 10 个连续但不重叠的高倍镜视野中有核细胞总数和免疫组织化学染色阳性细胞数计算阳性细胞百分率。4. 肾组织病理积分的评定方法 : 按我室制定方法^[4] 分别对肾小球和肾小管-间质的病理改变进行半定量评分。

三、统计学处理 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示 , 在进行多样本均数比较前 , 先行方差齐性检验 , 方差齐者采用 Newman-Keuls 法进行多个样本均数间每两均数比较 , 用最小显著差法 (LSD) 进行多个实验组与一个对照组之间的比较 ; 方差不齐者采用 Kruskal-Wallis 分析。两变量间相关分析采用 Pearson 相关分析。

结 果

一、PCNA 阳性细胞分布 NS 患儿肾小球和肾小管间质内均可见核呈棕黄色或棕褐色 PCNA 阳性细胞 , 以肾小管-间质内的阳性细胞数较多 ; 正常对照组肾小管-间质内大多亦可见 PCNA 阳性细胞 , 而肾小球内偶可见 PCNA 阳性细胞 ; 阴性对照的肾组织内未见 PCNA 阳性细胞。肾组织内 PCNA 染色结果 见图 1 (见插图 05-II)。

二、不同病理类型 NS 的肾小球和肾小管-间质内 PCNA 阳性细胞百分率比较 见表 1。

三、肾组织中 PCNA 表达与肾组织病理积分间的关系 肾小球内 PCNA 阳性细胞百分率与肾小球的病理积分呈正相关 , 相关系数为 0.748 ($r_s = 0.527 P < 0.001$) ; 肾小管-间质内 PCNA 的阳性细胞百分率与肾小管的病理积分呈正相关 , 相关系数为 0.650 ($r_s = 0.421 P < 0.01$)。

四、肾组织中 PCNA 表达与 NS 患儿肾活检前临床参数之间关系 肾小管-间质内 PCNA 阳性细胞数与 24 h 尿蛋白量呈正相关 , 相关系数为 0.662 ($r_s = 0.356 P < 0.05$) ; 肾小球内 PCNA 阳性细胞数与血清胆固醇呈正相关 , 相关系数为

0.571 ($r_s = 0.337 P < 0.05$) ; 其他指标间无明显相关。

讨 论

细胞周期蛋白 PCNA 是 DNA 合成酶 δ 的辅助因子 , 可与 DNA 合成酶结合而催化前导链合成 , 在 DNA 复制延长过程中起重要作用 , 是一种促进细胞周期循环的因子 , 是增殖细胞的标志之一^[5]。本文应用免疫组化检测肾组织内 PCNA 表达情况 , 发现 NS 患儿肾小球内 PCNA 阳性细胞数明显高于对照组 , 不同病理类型肾小球内 PCNA 阳性细胞数不同 , 肾小球内 PCNA 阳性细胞数与肾小球病理积分呈正相关 , 提示 PCNA 不仅能促进 NS 患儿肾脏固有细胞的增殖 , 也可反映 NS 患儿肾小球组织学损伤程度。Shiiki 等^[6] 研究也支持此观点 , 他们在嘌呤霉素肾病鼠模型中发现微小病变型肾病鼠 PCNA 阳性足细胞数明显多于正常对照组 , 局灶节段硬化型肾病鼠 PCNA 阳性足细胞数又明显多于微小病变型肾病鼠。

高脂血症是 NS 的主要临床表现之一 , 同时又可促进系膜细胞的增殖和肾小球硬化 , 促进 NS 慢性进展^[7,8]。通过本文分析 NS 患儿肾小球内 PCNA 阳性细胞数与肾活检前的临床参数的相关性发现 NS 患儿肾小球内 PCNA 阳性细胞数与肾活检前患儿血清胆固醇水平呈正相关 , 推测高胆固醇血症也可能通过改变 PCNA 表达水平 , 提高肾小球固有细胞的增殖活性而引起肾小球病理损害的进展。

近年来 , 肾小管-间质在肾脏病慢性进展中的作用日益受到重视。肾小管-间质在肾脏病慢性进展中的主要病理变化是间质纤维化 , 间质成纤维细胞的异常增殖和凋亡是间质纤维化的主要原因^[9,10]。本文发现 NS 患儿肾小管-间质内的 PCNA 阳性细胞数明显高于对照组 , 且与肾小管-间质的病理积分呈正相关 , 提示 PCNA 表达增加促进 NS 患儿肾小管-间质细胞增殖 , 同时也说明 PCNA 表达水平可反映肾小管-间质的组织学损伤程度。

大量蛋白尿作为一个独立的致病因素参与肾脏病变进展 , 其机制尚不清楚^[11]。大多认为大量蛋白尿时 , 尿中补体蛋白被近端肾小管刷状缘激活而引起补体依赖性肾小管-间质损伤^[12] , 亦有人认为是大量蛋白尿经肾小管重吸收 , 肾小管释放脂质巨噬细胞趋化因子 (Lipid macrophage chemotactic factor, LMCF) 引起肾间质巨噬细胞浸润所致^[13]。本文通过分析 NS 患儿肾小管-间质内 PCNA 阳性细胞数与肾活检前的临床参数之间的相关性 , 发现肾活检前的 24 h 尿蛋白量与肾小管-间质内 PCNA 阳性细胞数呈正相关 , 推测大量蛋白尿也可能通过改变肾小管-间质细胞的增殖活性而引起肾小管-间质的损伤。

由此可见 , PCNA 表达水平的增高促进原发性 NS 慢性进展 , 是判断原发性 NS 肾脏组织学损伤程度和预后的敏感指标。进一步研究如何阻断 PCNA 促肾脏固有细胞增殖的作用 , 将有助于延缓原发性 NS 的慢性进展 , 降低慢性肾功能不全的发生率。目前 , 我们正试图应用反义-PCNA 基因来阻断 PCNA 的作用。

表1 不同病理类型NS的肾小球、肾小管-间质内PCNA阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s$, 个/100个细胞)

Table 1 Comparison of PCNA positive cells between control and nephritic groups in glomerular and tubulointerstitium($\bar{x} \pm s$)

病理类型	n	肾小球内PCNA		肾小管和间质内	
		阳性细胞数	t	PCNA阳性细胞数	t
对照组	6	10.76 ± 3.43	-	12.55 ± 2.63	-
肾病组	39	28.57 ± 3.36 ^a	2.101	68.32 ± 11.61 ^b	3.962
微小病变型肾病	8	23.55 ± 4.63 ^{ac}	1.999	76.55 ± 12.61 ^{bd}	4.120
系膜增生型肾病	15	40.25 ± 5.11 ^{ac}	3.312	52.54 ± 15.03 ^{bd}	3.786
膜增生型肾病	7	27.51 ± 3.61 ^{ac}	2.025	61.05 ± 8.63 ^{bd}	3.920
局灶节段硬化型肾病	9	34.55 ± 5.13 ^{ac}	2.136	57.31 ± 9.21 ^{bd}	3.813

^a与对照组比较 $P < 0.05$ ^b与对照组比较 $P < 0.001$ ^c不同病理类型间两两比较 $P < 0.05$ ^d不同病理类型间两两比较 $P > 0.05$

[参考文献]

[1] Shankland SJ. Cell cycle regulatory proteins in glomerular disease[J]. Kidney Int, 1999, 56(4):1208-1215.
 [2] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(12):746-749.
 [3] 中华肾脏病学会肾脏病理协助组. 关于原发性肾小球疾病病理类型的命名的建议[J]. 中华肾脏病杂志, 1986, 2(2):172-174.
 [4] 李志辉, 易著文, 何小解, 等. 激素耐药型和激素依赖性肾病患儿肾脏病理计量分析[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(8):449-452.

(上接第356页) 急性白血病在诊断时90%以上已有脑膜侵犯。在有效治疗获得CR后TNF- α 降至正常更支持这一可能。诊断时已有CNLS患儿的CSF中TNF- α 水平更明显高于未并CNLS者, 与此时CNS内白血病细胞负荷进一步增大有关。

本文结果还显示CNLS时CSF中TNF- α 水平与白细胞增高程度密切相关, 且有效的鞘内注射治疗后TNF- α 恢复至正常时间迟于白细胞恢复正常时间, 这对判断CNLS的治疗效果和确定所需鞘内注射治疗次数有重要意义, 表明以CSF中TNF- α 正常化作为停止治疗指标能使治疗更加恰当^[12, 13]。

[参考文献]

[1] Baxter GT, Kuo RC, Jupp OJ, et al. Tumor necrosis factor- α mediates both apoptotic cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression[J]. J Biol Chem, 1999, 274(14):9539-9547.
 [2] Kobayashi D, Watanabe N, Yamauchi N, et al. Endogenous tumor necrosis factor as a predictor of doxorubicin sensitivity in leukemic patients[J]. Blood, 1997, 89(7):2472-2479.
 [3] 孙桂香, 李齐岳. 小儿急性白血病诊疗建议[J]. 中华儿科杂志, 1993, 31(5):285-287.
 [4] 王国洪, 连冬友, 赵枝元, 等. 肿瘤坏死因子放射免疫分析临床应用[J]. 中华放射免疫学杂志, 1995, 15(3):161-163.
 [5] Alexandrakis M, Coulocheri S, Xyloury I, et al. Elevated serum TNF- α concentrations are predictive of short ended survival in patients with

[5] 唐成和, 石太新, 赵卫星, 等. 急性白血病骨髓细胞增殖细胞核抗原、P53基因表达及其意义[J]. 实用儿科临床杂志 Shiyong Erke Linchuang Zazhi, 2002, 17(4):317-318.
 [6] Shiiki H, Sasaki Y, Nishino T, et al. Cell proliferation and apoptosis of the glomerular epithelial cells in rats with puromycin aminonucleoside nephrosis[J]. Pathology, 1998, 66(5):221-229.
 [7] Keane W. The role of lipids in renal disease: future challenges[J]. Kidney Int, 2000, 77(suppl):S27-S31.
 [8] Nishida Y, Oda H, Yorioka N. Effect of lipoproteins on mesangial cell proliferation[J]. Kidney Int, 1999, 71(suppl):S51-S53.
 [9] 黄凌虹, 张国强, 叶任高, 等. 细胞增殖与凋亡在单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化发病中的意义[J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(1):24-27.
 [10] 丁洁. 遗传性肾脏疾病诊断中应注意的几个问题[J]. 实用儿科临床杂志 Shiyong Erke Linchuang Zazhi, 2004, 19(1):4-6.
 [11] 陈明明. 急性肾炎与肾炎性肾病综合征血清IgG变化观察[J]. 河南医药信息, 1996, 11(11):21-22.
 [12] Hsu SI, Couser WG. Chronic progression of tubulointerstitial damage in proteinuric renal disease is mediated by complement activation: a therapeutic role for complement inhibitors[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(suppl 2):S186-S191.
 [13] Kees FD, Sadow J, Schreiner GF, et al. Tubular catabolism of albumin is associated with the release of an inflammatory lipid[J]. Kidney Int, 1994, 45(6):1697-1709.

high-risk myelodysplastic syndromes[J]. Haematologia, 1998, 29(1):13-14.
 [6] Bourantas KL, Hatzimichael EC, Makis AC, et al. Serum beta-2-microglobulin TNF-alpha and interleukins in myeloproliferative disorders[J]. Eur J Haematol, 1999, 63(1):19-25.
 [7] Frrajoli A, Keating MJ, Manshoury T, et al. The clinical significance of tumor necrosis-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia[J]. Blood, 2002, 100(4):1215-1219.
 [8] Capalbo S, Battista C, Delia M, et al. Evaluation of tumor necrosis factor-alpha and erythropoietin serum levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with anemia[J]. Acta Haematol, 2002, 108(2):84-89.
 [9] Warzocha K, Salles G, Bienvenu J, et al. Prognostic significance of TNF-alpha and its P55 soluble receptor in malignant lymphomas[J]. Leukemia, 1997, 11(suppl 3):S441-S443.
 [10] 陈书恩, 张秀明, 王富党, 等. 急性淋巴细胞性白血病儿血清可溶性肿瘤坏死因子受体检测的临床意义[J]. 实用儿科临床杂志 Shiyong Erke Linchuang Zazhi, 2000, 15(5):277-278.
 [11] Hao C, Parney IF, Roa WH, et al. Cytokine and cytokine receptor mRNA expression in human glioblastomas[J]. Acta Neuropathol, 2002, 103(2):171-178.
 [12] 谢红萍, 潘慈, 薛惠良. 儿童急性髓细胞性白血病复发原因[J]. 实用儿科临床杂志 Shiyong Erke Linchuang Zazhi, 2003, 18(2):120-121.
 [13] 孟庆恩, 姜淑英. 急性淋巴细胞白血病患者血清IL-8的变化及其意义[J]. 河南医药信息, 2002, 16(14):4-5.

血管内皮生长因子在佐剂关节炎大鼠滑膜组织中的表达

王金荣¹, 韩秀珍¹, 王永康², 吕晓霞³, 杜德利², 韩波¹, 庄建新¹, 李秋波¹, 马沛然¹
(山东大学临床医学院山东省立医院 1. 儿科 2. 病理科 3. 中心实验室, 山东 济南 250021)

[摘要] 目的 探讨血管内皮生长因子(VEGF)在佐剂关节炎大鼠滑膜组织中的表达及其与关节病理积分关系。方法 通过右足垫皮内注射完全福氏佐剂建立关节炎大鼠模型, 常规 HE 染色, 计算关节病理积分, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 VEGF mRNA 表达, 免疫组织化学染色检测 VEGF 蛋白表达, 观察 VEGF 蛋白表达与关节病理积分关系。结果 模型组大鼠滑膜 VEGF mRNA 及蛋白表达在 3、8 周及 20 周时均明显高于对照组(P 均 < 0.01), 而且与关节病理积分呈正相关($r = 0.984, 0.96, 0.929$ P 均 < 0.01)。结论 VEGF 在关节炎形成及发展过程中起重要作用, 可直接影响滑膜新生血管形成。

实用儿科临床杂志 2004, 19(5) 389-390

[关键词] 关节炎; 大鼠; 血管内皮生长因子; 佐剂

[中图分类号] R593.22 [文献标识码] A [文章编号] 1003-515X(2004)05-0389-02

Expression of vascular endothelial growth factor in synovium of rats with adjuvant arthritis

WANG Jin-rong¹, HAN Xiu-zhen¹, WANG Yong-kang², LV Xiao-xia³, DU De-li², HAN Bo¹, ZHUANG Tian-xin¹, LI Qiu-bo¹, MA Pei-ran¹

(1. Department of Pediatrics 2. Department of Pathology 3. Central Lab, Shandong Provincial Hospital, Clinical Medical College of Shandong University, Jinan 250021, China)

Abstract Objective To investigate the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in synovium of rats with adjuvant arthritis and the relationship between the histopathologic score and the expression of VEGF. **Methods** Adjuvant arthritis was established in Wistar rats by inoculating complete Freund's adjuvant(CFA). We calculated the arthropathologic score and the expression of VEGF mRNA and protein at different stages after CFA inoculation. **Results** In model group the arthropathologic score and expression of VEGF protein in synovium increased significantly all the time($P < 0.01$), and there were close association between the arthropathologic score and the expression of VEGF protein($r = 0.984, 0.96, 0.929$ $P < 0.01$) respectively. **Conclusion** VEGF plays an important role in the progress of arthritis which can directly affect the formation of new vessel of synovium.

J Appl Clin Pediatr 2004, 19(5) 389-390

Key words arthritis; rat; vascular endothelial growth factor; adjuvant

近几年研究表明血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对内皮细胞生长有重要作用, 它能促进血管增生和增强血管通透性。类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的主要病理特点是慢性反复性滑膜炎^[1]。VEGF在RA形成及发展过程中病理作用尚未完全阐明。本文通过佐剂关节炎(AA)大鼠模型, 动态观察关节炎滑膜 VEGF 蛋白表达与病理积分关系, 探讨 VEGF 在 RA 发病过程中作用及其机制。

材料与方法

一、材料 40只6周龄 Wistar 健康雄性大鼠, 体质量(175 ± 15)g, 购于山东大学西校区实验动物中心。卡介苗

(BCG)由兰州生物制品研究所生产。完全福氏佐剂(CFA)由美国 Gibco 公司生产。免疫组织化学成套试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。Trizol 美国 Gibco 公司提供, 逆转录酶由美国 Promega 公司提供, VEGF 寡聚核苷酸引物由上海生物工程有限公司提供。

二、方法 1. 随机将大鼠分成 2 组: 对照组($n = 16$)和模型组($n = 24$)。取模型组大鼠右足垫, 在无菌条件下, 皮内注射 0.1 ml CFA, 对照组在同一部位, 同样方法注射 0.1 ml 生理盐水。2. 病理学和免疫组织化学检测及半定量分析 接种 CFA 后第 3 周分别处死大鼠, 对照组 4 只, 模型组 8 只; 第 8、20 周分别处死大鼠, 对照组 6 只, 模型组 8 只。无菌取滑膜组织, 用 10% 甲醛固定, 以备做 HE 染色及免疫组织化学检测。光镜下观察组织形态变化, 并参照文献[1]计算关节病理积分。免疫组织化学检测用链霉亲和素-生物素-酶复合物法, VEGF 阳性细胞为细胞浆着色, 呈颗粒状棕黄色或棕褐色。3. 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR): 无菌条件下, 将大鼠

[收高日期] 2003-12-14

[作者简介] 王金荣(1963-), 女, 主治医师, 博士学位, 研究方向为风湿病和心血管病学

踝关节去皮毛及肌腱充分暴露滑膜,迅速取下滑膜组织,用0.1%DEPC处理过0.1mmol/L PBS缓冲液冲洗干净,迅速装入液氮中保存备用。滑膜组织中RNA提取按照Gibco公司提供说明书进行。VEGF上游引物5'-GGTGAAGTTCATG-GACGTCTA-3';下游引物5'-GTCTGCGGATCTTGGACAAAC-3'。

三、统计学处理 数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 10.0统计软件包进行处理。

结 果

一、AA大鼠滑膜病理学改变及关节病理积分 1.病理学改变:可见肉芽组织及血管翳形成。20周时滑膜细胞排列紊乱,滑膜下层有淋巴细胞、单核细胞及浆细胞浸润,软骨呈纤维素样坏死(见图1(见插图05-III))。2.AA大鼠不同时期关节病理积分(见表1)。

二、VEGF染色结果(见表2)。滑膜组织中VEGF阳性细胞主要为滑膜细胞、血管内皮细胞及单核-巨噬细胞(见图2(见插图05-III))。

三、VEGF蛋白表达与大鼠关节病理积分关系 表达VEGF阳性细胞百分数与关节病理积分在3、8周及20周均呈正相关($r=0.984, 0.960, 0.929$ P 均 <0.01)。

四、VEGF mRNA表达 RT-PCR检测,VEGF转录产物为432 bp,以接种佐剂后第8周表达最明显。

表1 AA大鼠不同时期关节病理积分($\bar{x} \pm s$,分)

Table 1 Joint pathological score of AA rats in different stages($\bar{x} \pm s$, scores)

分组	3周	8周	20周
对照组	0	0	0
模型组	3.0±0.6	3.2±0.6	2.0±0.8
t	-14.93	-15.34	-6.69
P	<0.01	<0.01	<0.01

表2 AA大鼠滑膜 VEGF 阳性细胞百分率($\bar{x} \pm s$,%)

Table 2 Percentage of VEGF positive cell in synovium of rats

分组	3周	8周	20周
对照组	5.0±0.8	5.2±1.0	5.3±0.5
模型组	54.1±4.1	54.3±4.0	32.0±3.5
t	-32.88	-33.18	-11.8
P	<0.01	<0.01	<0.01

讨 论

佐剂关节炎是细菌学家 Freund 创立的、用 CFA 免疫敏感种系大鼠诱导的一种免疫性动物关节炎模型,除表现四肢关节红肿外,还可见耳及尾部出现炎性小结及变性性角膜翳等

关节外表现,其发病机制及病理特征与人类 RA 极为相似。

VEGF 是一种相对分子量约 46 的高度糖基化的碱性蛋白,是内皮细胞特异性有丝分裂原^[2],可促进内皮细胞增殖,参与血管分化和生成^[3,4],提高血管通透性,促使炎性细胞渗出。促进内皮细胞血浆蛋白溶酶激活物,并诱导组织因子、蛋白水解酶等在内皮细胞表达,从而改变血管外基质诱导血管形成^[5]。本文发现正常滑膜组织也表达少量 VEGF,说明 VEGF 在维持滑膜正常功能中起一定作用。接种佐剂 3 周后 AA 大鼠关节滑膜层及滑膜下层有大量 VEGF 阳性细胞,表达 VEGF 阳性细胞百分率均显著高于正常对照组,其中主要是炎性浸润细胞中的单核-巨噬细胞、浆细胞及少量滑膜细胞^[6,7]。8 周后 AA 大鼠滑膜组织以滑膜细胞呈肿瘤样增生、大量新生血管形成为特点,表达 VEGF 阳性细胞主要是滑膜细胞、新生血管内皮细胞及部分浸润炎性细胞,20 周后 AA 大鼠滑膜组织部分纤维化,此期 VEGF 表达细胞较 8 周时已明显减少,但仍显著高于正常对照组。而且,各阶段 VEGF 表达细胞百分数与关节病理积分均呈正相关,表明 VEGF 是滑膜炎进展过程中极为重要的细胞因子,直接通过滑膜细胞、血管内皮细胞及浸润单-巨噬细胞等起作用。VEGF 的主要靶细胞是血管内皮细胞,通过增加血管内皮细胞的有丝分裂,促进新生血管形成,通过增强血管通透性,促进炎性渗出,进而促进炎症的形成和发展。因此,VEGF 在关节炎形成及病理进展过程中有重要作用。

[参考文献]

[1] Hom JT, Estridge T, Cole H, et al. Effects of various anti-T cell receptor antibodies on the development of type II collagen-induced arthritis in mice [J]. Immunol Invest, 1993, 22(4): 257 - 265.

[2] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [J]. Science, 1989, 246: 1306 - 1309.

[3] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice [J]. Nature, 1995, 376 (6535): 62 - 66.

[4] Luo F, Wariaro D, Lundberg G, et al. Vascular growth factor expression in a rat model of severe limb ischemia [J]. J Surg Res, 2002, 108(2): 258 - 267.

[5] Lopez JJ, Laham RJ, Stamler A, et al. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs [J]. Cardiovasc Res, 1998, 40(2): 272 - 281.

[6] Hitchon C, Wong K, Ma G, et al. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts [J]. Arth Rheu, 2002, 46(10): 2587 - 2597.

[7] 甄小芳, 马嵩春, 么远. 幼年类风湿性关节炎 96 例的预后和转归 [J]. 实用儿科临床杂志 Shiyong Erke Linchuang Zazhi, 2004, 19(3): 201 - 203.

血管内皮生长因子在佐剂关节炎大鼠滑膜组织中的表达

(正文见第 389 页)

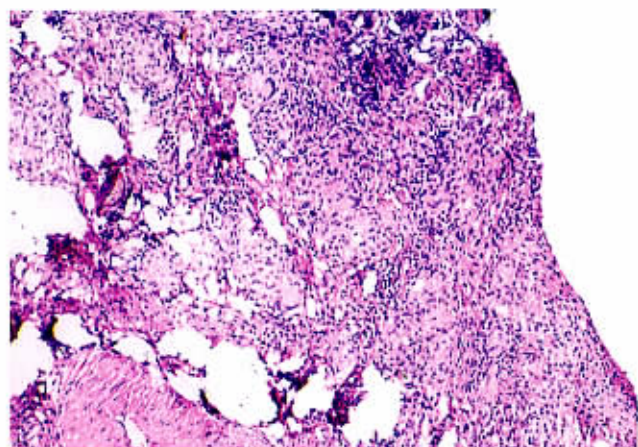


图 1 佐剂关节炎滑膜细胞增生,层次增多,可见多核巨细胞
Figure 1 Synovial tissue of AA group rats showed synovial cells hyperplasia, inflammatory cells accumulated and multinuclear giant cell appeared

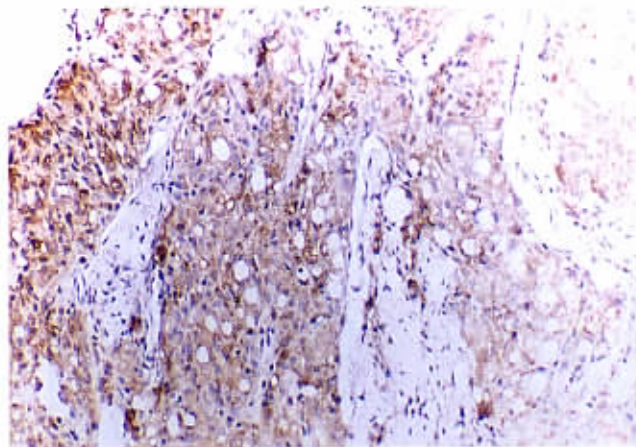


图 2 佐剂关节炎滑膜组织中 VEGF 蛋白表达
Figure 2 Synovial tissue of AA group rats showed a lot of cells expressed VEGF

急性播散性脑脊髓炎 12 例临床研究

(正文见第 398 页)



图 1 1 例患儿于病程 1 个月时头颅 MRI (Flair 像), 可见白质内广泛高信号病灶
Figure 1 Cranial MR(Flair images) of a patient(1 month after onset of the illness)showed kiffuse hyperintense lesions in white matter



图 2 该患儿经治疗后于病程 6 个月时头颅 MRI (Flair 像), 原病灶明显吸收
Figure 2 Cranial MR(Flair imagos) of the same patient(after treatment,6 months after onset of the illness)showed the previous lesions were obviously absorbed