

# 血管内皮生长因子与肿瘤坏死因子 - $\alpha$ 在佐剂关节炎大鼠滑膜中表达 \*

王金荣<sup>1</sup>, 韩秀珍<sup>2</sup>, 王永康<sup>2</sup>, 吕晓霞<sup>2</sup>, 王宏伟<sup>1</sup>, 韩波<sup>2</sup>, 庄建新<sup>2</sup>, 杨渝珍<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 湖北 武汉 430030; <sup>2</sup>山东大学临床医学院山东省立医院, 山东 济南 250021; <sup>3</sup>华中科技大学同济医学院实验医学研究中心 生化及分子生物学研究室, 湖北 武汉 430030)

[ 摘要 ] 目的 探讨血管内皮生长因子(VEGF)和肿瘤坏死因子 -  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ) 在佐剂关节炎(AA)大鼠滑膜组织中的表达及其与关节病理积分的关系。方法:建立 AA 大鼠模型,常规 HE 染色,计算关节病理积分,并用免疫组织化学染色检测 VEGF 和 TNF -  $\alpha$  蛋白表达。结果:AA 组大鼠滑膜 VEGF 和 TNF -  $\alpha$  蛋白表达在 3 周、8 周及 20 周时均明显高于健康对照组(均  $P < 0.01$ ),且二者均与关节病理积分呈显著正相关(均  $P < 0.01$ ),二者之间亦呈显著正相关(均  $P < 0.01$ )。结论:VEGF 和 TNF -  $\alpha$  在关节炎的形成及发展过程中起重要作用,二者互相作用并影响滑膜新生血管的形成。

[ 关键词 ] 内皮生长因子;肿瘤坏死因子;滑膜;关节炎,实验性;关节炎,类风湿

[ 中图分类号 ] R363 [ 文献标识码 ] A

肿瘤坏死因子 -  $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF -  $\alpha$ ) 是类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)发病过程中极为重要的炎性细胞因子<sup>[1]</sup>,TNF -  $\alpha$  可抑制滑膜细胞凋亡,促进滑膜细胞增生。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<sup>[2]</sup>。VEGF 在 RA 形成及发展过程中的作用,以及 VEGF 与 TNF -  $\alpha$  的关系报道较少。本研究通过佐剂关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠模型,观察 AA 滑膜 VEGF 与 TNF -  $\alpha$  蛋白表达与病理积分的关系,探讨 VEGF 与 TNF -  $\alpha$  在 RA 发病过程中的作用及其机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物及试剂

40 只 6 周龄健康 Wistar 雄性大鼠,体重(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。完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA):由美国 Gibco 公司生产。兔抗大鼠单克隆抗体 VEGF(No. BA0407)与 TNF -  $\alpha$  (No. BA0131)二抗羊抗兔血清、免疫组化成套试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 2 分组及模型复制方法

随机将大鼠分成 2 组,对照组:16 只;佐剂关节炎(AA)组 24 只。无菌条件下,取 AA 组大鼠的右足垫,皮内注射 0.1 mL CFA(含 BCG 1 mg),对照组在同部位注射 0.1 mL 生理盐水。

### 3 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、AA 组 8 只;第 8 周、20 周分别处死大鼠对照组各 6 只,AA 组各 8 只。无菌取踝关节滑膜组织,用 10% 的甲醛液固定,以备做病理及免疫组织化学检测。常规 HE 染色,光镜下观察组织形态变化,并参照文献<sup>[3]</sup>的标准计算关节病理积分:正常为 0 分;滑膜轻度炎症增生为 1 分;滑膜中度炎症增生为 2 分;滑膜中度炎症增生及轻度软骨及骨改变为 3 分;有严重滑膜炎、纤维增生、软骨及骨破坏为 4 分。

免疫组化检测用 SABC(链霉亲和素生物素酶复合物)法,阴性对照 PBS 代替一抗,DBA 显色,苏木素复染,光镜下观察。VEGF 与 TNF -  $\alpha$  阳性细胞均为细胞浆着色,呈颗粒状的棕黄色或棕褐色。阳性细胞的计数用目镜网格测微尺(10 × 10 方格表)进行半定量计数,滑膜组织 TNF -  $\alpha$  及 VEGF 阳性细胞数均按以下计算:每个切片随机取 5 个高倍视野,分别计算每个视野 5 × 10 方格中的 VEGF 或 TNF -  $\alpha$  阳性细胞数占该区域中细胞总数的百分数,求其平均值。

### 4 统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件包进行处理,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验。

[ 收稿日期 ] 2003 - 04 - 04 [ 修回日期 ] 2003 - 06 - 02

\* [ 基金项目 ] 国家自然科学基金资助项目(No. 30070722)

Tel : 027 - 83663315 ; E - mail : doc\_wang28@hotmail.com

## 结 果

### 1 AA 大鼠滑膜病理学改变及关节病理积分

**1.1 病理学改变** 正常对照组滑膜层有 2-3 层滑膜细胞较疏松的平行排列,滑膜下层为疏松层,有丰富的血管、淋巴、脂肪及肽能神经构成。AA 组 3 周时滑膜充血水肿,有灶性坏死及纤维蛋白性渗出,可见到大量淋巴细胞、单核细胞及少量中性粒细胞浸润。8 周时滑膜内有大量淋巴细胞、浆细胞及单核巨噬细胞呈局限性或弥漫性浸润。滑膜细胞增生,层次增多,可见到多核巨细胞,细胞核位于细胞浆外周,成花环状排列(图 1)。可见肉芽组织及血管翳形成。20 周时 AA 组滑膜细胞明显增多,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。

表 2 AA 大鼠滑膜 VEGF 与 TNF-α 阳性细胞百分率

Tab 2 The percentage of VEGF and TNF-α positive cells in the synovium of AA rat(% .  $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	3 weeks		8 weeks		20 weeks	
		VEGF	TNF-α	VEGF	TNF-α	VEGF	TNF-α
Control	6	5.0±0.8	5.5±1.0	5.2±1.0	5.3±0.8	5.3±0.5	5.4±0.5
AA	8	54.1±4.1*	55.3±2.6*	54.3±4.0*	54.1±4.3*	32.0±3.5*	30.4±2.9*

\* P<0.01 vs control.

### 3 VEGF 蛋白表达与大鼠关节病理积分的关系

表达 VEGF 阳性的细胞百分数与关节病理积分在 3 周、8 周及 20 周均呈显著正相关关系( $r$  分别等于 0.984、0.998 及 0.957 均  $P<0.01$ )。

### 4 TNF-α 蛋白表达与大鼠关节病理积分的关系

表达 TNF-α 阳性的细胞百分数与关节病理积分在 3 周、8 周及 20 周均呈显著正相关关系( $r$  分别等于 0.977、0.995 及 0.978,  $P<0.01$ )。

### 5 VEGF 与 TNF-α 蛋白表达的相关关系表达

VEGF 及 TNF-α 阳性的细胞百分数在 3 周、8 周及 20 周均呈显著正相关关系( $r$  分别等于 0.998、0.998 及 0.991,  $P<0.01$ )。

## 讨 论

VEGF 是一个分子量约为 46 kD 的高度糖基化的碱性蛋白,是内皮细胞的特异性有丝分裂原<sup>[4]</sup>,可促进内皮细胞增殖,参与血管分化和生成<sup>[5,6,13]</sup>,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的表达,从而改变血管外基质诱导血管形成<sup>[7]</sup>。本研究发现正常的滑膜组织也少量表达 VEGF 和 TNF-α,提示 VEGF 和 TNF-α 在维持滑膜

1.2 AA 大鼠不同时期的关节病理积分 由表 1 可以看出接种 CAF 3 周、8 周、20 周 AA 组大鼠滑膜病理积分均明显高于正常对照组(均  $P<0.01$ )。

表 1 AA 大鼠不同时期的关节病理积分

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

Group	n	3 weeks	8 weeks	20 weeks
Control	6	0	0	0
AA	8	3.0±0.6*	3.2±0.6*	2.0±0.8*

\* P<0.01 vs control.

### 2 VEGF 与 TNF-α 的染色结果

正常对照组大鼠的滑膜组织中仅见少量的 VEGF 与 TNF-α 阳性细胞,而在 AA 大鼠接种 CFA 3 周、8 周、20 周滑膜组织中的 VEGF 与 TNF-α 阳性细胞数均明显高于对照组(均  $P<0.01$ ),主要为滑膜细胞、血管内皮细胞及单核-巨噬细胞(图 2-6)。

的正常功能中起一定作用。接种完全免疫佐剂 3 周后 AA 大鼠关节滑膜层及滑膜下层有大量的 VEGF 和 TNF-α 阳性细胞,表达 VEGF 和 TNF-α 的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、浆细胞及少量的滑膜细胞<sup>[8]</sup>;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 和 TNF-α 阳性的细胞主要是滑膜细胞、新生血管内皮细胞及部分浸润的炎性细胞,20 周后,AA 大鼠滑膜组织部分纤维化,此期的 VEGF 和 TNF-α 阳性表达细胞较 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 和 TNF-α 阳性表达细胞百分数与关节病理积分均呈正相关,表明 VEGF 和 TNF-α 可能是滑膜炎进展过程中重要的细胞因子,直接通过滑膜细胞、血管内皮细胞及浸润的单核巨噬细胞等起作用,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,通过增强血管的通透性,促进炎性渗出,进而促进炎症的形成和发展。因此,VEGF 在关节炎的形成及病理进展过程中有极其重要的作用。各阶段 TNF-α 与 VEGF 阳性表达细胞百分数均呈显著正相关,表明:① VEGF 的分泌受 TNF-α 的调节,即 TNF

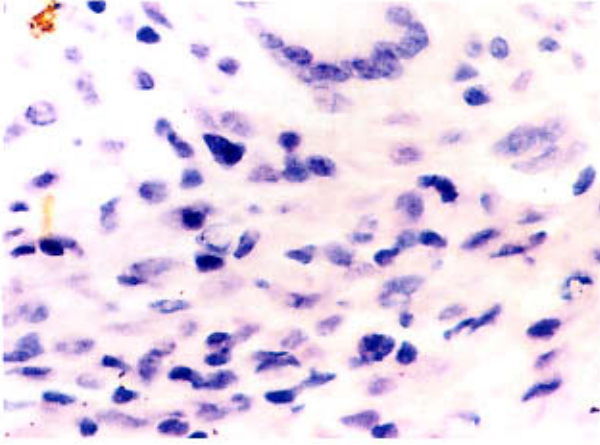


Fig 1 Langhans' cells (HE staining, ×400).

图 1 朗罕细胞

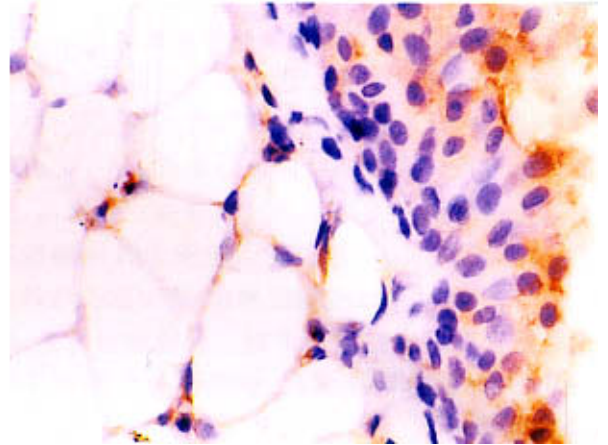


Fig 2 The synovial tissue of control rats showed that a few of cells expressed the VEGF (DBA staining, ×400).

图 2 对照组滑膜组织 VEGF 蛋白表达

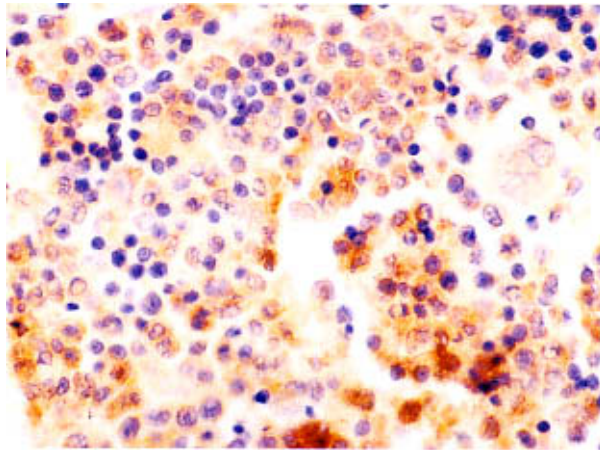


Fig 3 The synovial tissue of rats in AA group showed that lots of cells expressed the VEGF at the 3rd week (DBA staining, ×400).

图 3 3 周 AA 组滑膜组织 VEGF 蛋白表达

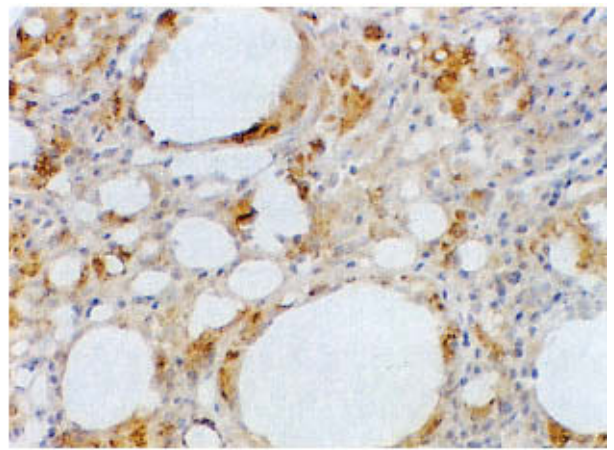


Fig 4 The synovial tissue of rats in AA group showed that many cells expressed the VEGF at the 8th week (DBA staining, ×200).

图 4 8 周 AA 滑膜组织 VEGF 蛋白表达

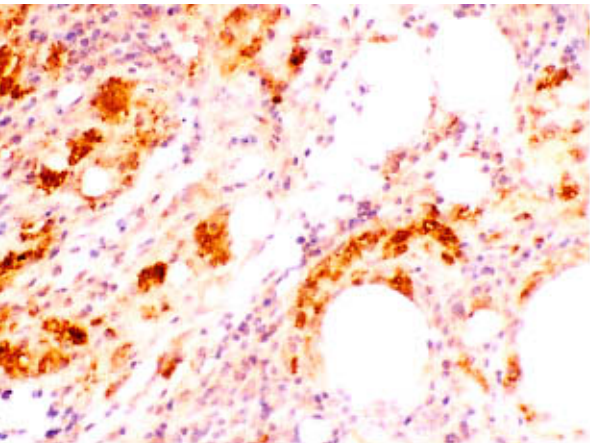


Fig 5 The synovial tissue of rats in AA group showed that a lot of cells expressed the TNF-α at the 8th week (DBA staining, ×200).

图 5 8 周 AA 组滑膜组织 TNF-α 蛋白表达

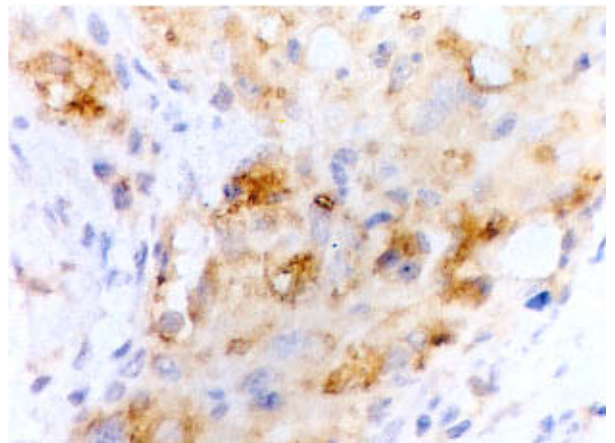


Fig 6 The synovial tissue of rats in AA group showed that many cells still expressed VEGF at the 20th week (DBA staining, ×400).

图 6 20 周 AA 组滑膜组织 VEGF 蛋白表达

-α 参与炎症调控,可能主要通过上调 VEGF 的分泌而促进滑膜新生血管的形成<sup>[9,10]</sup>。TNF-α 直接或间接通过滑膜细胞、血管内皮细胞及浸润的单核巨噬细胞起作用,增强血管的通透性,促进炎症渗出,进而促进炎症的形成和发展<sup>[11]</sup>。②VEGF 与 TNF-α 在 AA 发病过程中互相影响<sup>[12]</sup>,共同发挥作用。这些发现为今后运用单克隆抗体治疗类风湿性关节炎提供了有力的理论依据。

[参 考 文 献]

[ 1 ] Maini RN ,Feldmann M. How does infliximab work in rheumatoid arthritis ?[ J ]. Arthritis Res ,2002 ,Suppl 2 S22 - S28.  
 [ 2 ] Polverini PJ. Angiogenesis in health and disease :insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities[ J ]. J Dent Educ 2002 ,66( 8 ) 962 - 975.  
 [ 3 ] 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 mic[ J ]. Immunol Invest ,1993 ,22 ( 4 ) 257 - 265.  
 [ 4 ] Leung DW ,Cachianes G ,Kuang WJ ,et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen[ J ]. Science ,1989 ,246( 4935 ) :1306 - 1309.  
 [ 5 ] Shalaby F ,Rossant J ,Yamaguchi TP ,et al. Failure of blood - island formation and vasculogenesis in Flk - 1 - deficient mic[ J ]. Nature ,1995 ,376( 6535 ) :62 - 66.  
 [ 6 ] 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.  
 [ 7 ] Lopez JJ ,Laham RJ ,Stamler A ,et al. VEGF administration chronic myocardial ischemia in pigs[ J ]. Cardiovasc Res ,1998 ,40( 2 ) 272 - 281.  
 [ 8 ] 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 ]. Arthritis Rheum ,2002 ,46( 10 ) 2587 - 2597.  
 [ 9 ] Bottomley MJ ,Webb NJ ,Watson CJ ,et al. Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor ( VEGF ) : specific up - regulation by tumor necrosis factor - alpha ( TNF - alpha ) in synovial fluid[ J ]. Clin Exp Immunol ,1999 ,117 ( 1 ) :171 - 176.  
 [ 10 ] Yamaguchi R ,Yano H ,Iemura A ,et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma[ J ]. Hepatology ,1998 ,28( 1 ) :68 - 77.  
 [ 11 ] Dinarello CA. Proinflammatory cytokines[ J ]. Chest ,2000 ,118( 2 ) :503 - 508.  
 [ 12 ] Sugano M ,Tsuchida K ,Tomita H ,et al. Increased proliferation of endothelial cells with overexpression of soluble TNF - alpha receptor I gen[ J ]. Atherosclerosis ,2002 ,162( 1 ) :77 - 84.  
 [ 13 ] 王新红 ,殷莲华 ,金惠铭. VEGF 高表达的胶质瘤细胞 C6 对共培养微血管内皮细胞表达 Flk - 1 及 Flt - 1 的影响[ J ]. 中国病理生理杂志 ,2002 ,18( 11 ) :1365 - 1369.

**Expression of vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor - alpha in synovium of rats with adjuvant arthritis**

WANG Jin - rong<sup>1</sup> , HAN Xiu - zhen<sup>2</sup> , WANG Yong - kang<sup>2</sup> , LÜ Xiao - xia<sup>2</sup> ,  
 WANG Hong - wei<sup>1</sup> , HAN Bo<sup>2</sup> , ZHUANG Jian - xin<sup>2</sup> , YANG Yu - zhen<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Department of Pediatrics , Tongji Hospital , <sup>3</sup> Experimental Medical Center , Tongji Medical College , Huazhong University of Science and Technology , Wuhan 430030 , China ; <sup>2</sup> Shandong Provincial Hospital , Clinical Medical College of Shandong University , Jinan 250021 , China )

[ ABSTRACT ] AIM : To investigate the expression of vascular endothelial growth factor ( VEGF ) and tumor necrosis factor - alpha ( TNF - α ) in synovium of rats with adjuvant arthritis ( AA ) and the relationship between the pathological score and the expression of VEGF and TNF - α protein. METHODS : AA was produced in Wistar rats by inoculating complete Freund 's adjuvant ( CFA ). The arthral pathological score was calculated , production of VEGF and TNF - α protein were assayed by histoimmunochemical staining at different stage after CFA inoculation. RESULTS : In AA group , the pathological score and expression of VEGF protein in synovium increased significantly ( P < 0.01 ). There was significant positive correlation between the pathological score and protein expression of VEGF and TNF - α , respectively ( P < 0.01 ). CONCLUSIONS : VEGF and TNF - α may play an important role in the progress of arthritis. They interact with each other and affect the vascularization in the synovial tissue.

[ KEY WORDS ] Endothelial growth factors ; Tumor necrosis factor ; Synovial membrane ; Arthritis , experimental ; Arthritis , rheumatoid