

光模型阳性组中远较阴性组高 ($P < 0.001$)。MPO、CG 为主要靶抗原,与文献报道有较大差异。一般认为以 LF 表达为主^[3,4],Manolova 等^[2]报道以 BPI 为主,Bakkaloglu 等^[5]却认为以 MPO 为主。我们还发现,SLE 的活动性与 ANCA 靶抗原的表达也存在关联。SLE 活动期患者组的 ANCA 靶抗原表达明显高于静止组 ($P < 0.01$),以 MPO、CG 为主。我们推测 ANCA 靶抗原可能是导致 SLE 活动性的一种内在因素,这与 ANCA 荧光模型在不同活动性 SLE 检出率相符。但各靶抗原在不同活动期组间无统计学差异,这可能与本研究所观察的病例数相对较少有关。文献^[2,7]也有相似报道。

在 ANCA 的表达与 SLE 患者的临床表现的相关性研究中存在根本分歧。Molnar 等^[1]认为 ANCA 的表达与临床表现无相关,但有作者认为^[2-5,7],ANCA 的表达与临床表现密切相关,推测是后者发生的内因。我们发现贫血、血小板、蛋白尿等指标在 ANCA 阳性组阳性率明显高于 ANCA 阴性组,而蝶形红斑、白细胞、ESR、ANA、dsDNA、Sm 抗体、RF 等在两组间无明显差异。我们认为:ANCA 的表达与 SLE 某些临床表现存在相关,在机体免疫功能异常状况下,有否存在 ANCA 与正常组织成分结合后所导致的靶组织免疫损伤可能是产生某些 SLE 特殊临床表现的主要原因。

需指出的是,ANA 在 SLE 中阳性率很高,且很难与 pANCA 区别,从而引起 ANCA 假阳性。Chin 等^[3]在 ANCA 阳性时必须再检测 dsDNA 和 ssDNA 以排除其他自身抗体的干扰。Radice 等^[8]发现采用不同基质时会产生不同的 IIF 结果。我们采用生物薄片技术,根据经不同处理的底物细胞所表达的荧光模型进行判断,有效避免了 ANA 的干扰,保证了结果的准确性。当然,同时用 ELISA 检测 ANCA 靶抗原,更有助于进一步提高检测结果的可靠性。

参考文献

- 1 Molnar K ,Kovacs L ,Kiss M ,et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Dermatol 2002 ,27 :59-61.
- 2 Manolova I ,Dancheva M ,Halacheva K. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with systemic lupus erythematosus :prevalence , antigen specificity ,and clinical associations. Rheumatol Int ,2001 ,20 :197-204.
- 3 Chin HJ ,Ahn C ,Lim CS ,et al. Clinical implications of antineutrophil cytoplasmic antibody test in lupus nephritis. Am J Nephrol ,2000 ,20 :57-63.
- 4 Galeazzi M ,Morozzi G ,Sebastiani GD ,et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in 566 European patients with systemic lupus erythematosus :prevalence ,clinical associations and correlation with other autoantibodies. European Concerted Action on the Immunogenetics of SLE. Clin Exp Rheumatol ,1998 ,16 :541-546.
- 5 Bakkaloglu A ,Topaloglu R ,Saatci U ,et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in childhood systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol ,1998 ,17 :265-267.
- 6 Faure-F MA ,Rodriguez-S RS ,Arias-V R ,et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus in childhood. J Rheumatol ,1999 ,26 :2480-2481.
- 7 Chikazawa H ,Nishiya K ,Matsumori A ,et al. Immunoglobulin isotypes of anti-myeloperoxidase and anti-lactoferrin antibodies in patients with collagen diseases. J Clin Immunol 2000 ,20 :279-286.
- 8 Radice A ,Vecchi M ,Bianchi MB ,et al. Contribution of immunofluorescence to the identification and characterization of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. The role of different fixatives. Clin Exp Rheumatol 2000 ,18 :707-712.

(收稿日期 2003-05-13)

(本文编辑 郝慧琴)

羟氯喹对佐剂性关节炎大鼠滑膜血管内皮生长因子表达的影响

王金荣 韩秀珍 吕晓霞 王永康 庄建新 韩波 李秋波

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)滑膜血管翳形成过程中起关键作用的细胞因子,可特异性地作用于内皮细胞,促进滑膜新生血管的形成,增强血管通透性,导致 RA 滑膜组织的病理性改变。近十几年,羟氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)作为改变病情的抗风湿类药物用于临床,疗效较好,但其作用机制尚未完全阐明。本文通过建立佐剂性

关节炎(AA)大鼠模型,观察 HCQ 对 AA 大鼠滑膜组织中 VEGF 蛋白及 mRNA 表达的影响,阐明 HCQ 治疗 AA 的疗效及其作用机制。

1 资料与方法

1.1 动物及试剂 6 周龄健康 Wistar 雄性大鼠,购于山东大学西校区实验动物中心。卡介苗(60 mg/支):由兰州生物制品研究所生产。完全弗氏佐剂(CFA):美国 Gibco 公司生产。羟氯喹:上海中西药业股份有限公司生产。萘普生:济南永宁制药股份有限公司生产。泼尼松:上海信谊制药厂生产。免疫组织化学成套试剂盒:购于武汉博士德生物工程有限公司。Trizol:美国 Gibco 公司生产。逆转录酶:美国 Promega

作者单位 250021 济南 山东大学临床医院山东省立医院儿科(王金荣、韩秀珍、庄建新、韩波、李秋波),中心实验室(吕晓霞),病理科(王永康)万方数据

公司。VEGF 寡聚核苷酸引物 :上海生物工程有限公司合成。

1.2 分组及造模方法 :随机将 88 只 Wistar 大鼠分成 5 组, A 正常对照组 (16 只); B:AA 组 (24 只); C:羟氯喹组 (16 只); D:泼尼松组 (16 只); E:萘普生组 (16 只)。取 B、C、D、E 组大鼠的右足垫, 在无菌条件下, 皮内注射 0.1 ml CFA, A 组在同一部位, 同样方法注射 0.1 ml 生理盐水。

1.3 给药方法 :C、D、E 组均于接种 CFA 后第 21 天始灌胃给药, C 组给予萘普生 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 共 1 个月; 羟氯喹 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 共 5 个月; D 组给予泼尼松 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 共 1 个月; 泼尼松 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 1 个月后减为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 再用 4 个月; E 组给予萘普生 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 共 1 个月。

1.4 病理学和免疫组织化学检测及半定量分析 :于接种 CFA 后第 3 周分别处死大鼠 A 组 4 只、B 组 8 只, 第 8、20 周分别处死大鼠 A 组各 6 只, 其余组各 8 只。无菌取滑膜组织, 用 10% 的甲醛固定, 做厚度为 $5 \mu\text{m}$ 的石蜡切片, 做苏木素-伊红 (HE) 染色, 常光镜下观察组织形态变化并参照文献 [1] 的标准计算关节病理积分; 免疫组织化学检测 (用 SABC 法, 即:链霉亲和素-生物素-过氧化物酶技术), VEGF 阳性细胞为细胞质着色, 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 VEGF 阳性细胞数按以下计算: 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 阳性细胞数占该区域中细胞总数的百分数, 求其平均值。

1.5 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) :无菌条件下, 将大鼠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% 的二碳酸二乙酯 (DEPC) 处理过的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗干净, 迅速装入液氮中保存备用。滑膜组织中的 RNA 的提取按照 Gibco 公司提供的说明书进行。VEGF 上游引物 $5' \text{-GGTGAAGTTCATGGACGCTCTA-3}'$; 下游引物 $5' \text{-GTCTGCGGATCTTGGACAAAAC-3}'$ 。

1.6 统计学方法 :所得数据用 SPSS 10.0 统计软件包进行处理。检测数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2 结 果

2.1 病理改变 :各实验组注射 CFA 后约 20 h 出现右后足红、肿、热, 第 3 天达高峰, 然后逐渐减退, 约 1 周后右后足再度肿胀, 且逐渐加重, 2 周左右波及对侧足和全身, 出现多发性关节炎、皮疹、耳及尾部炎性结节, 第 3 周病变最重, 病理切片可见滑膜层细胞局部有脱落, 有灶性坏死及纤维性渗出, 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 B 组病理切片滑膜不规则增厚, 可见肉芽组织及血管翳形成, 羟氯喹组及泼尼松组病变明显减轻。在第 10 周 B、E 组各有 5 只大鼠 (63%) 表现右后足多关节畸形; C 组无畸形; D 组有 1 只大鼠 (12%) 出现关节畸形。

2.2 AA 大鼠不同时期的关节病理积分 :见表 1。

表 1 各组大鼠不同时期的关节病理积分 ($\bar{x} \pm s$)

分组	3 周		8 周		20 周	
	只数	积分	只数	积分	只数	积分
A 组	4	0	6	0	6	0
B 组	8	$3.0 \pm 0.6^*$	8	$3.2 \pm 0.6^*$	8	$2.0 \pm 0.8^*$
C 组			8	$2.2 \pm 0.7^{*\Delta}$	8	$0.9 \pm 0.6^{*\Delta}$
D 组			8	$1.6 \pm 0.6^{*\Delta\#}$	8	$1.0 \pm 0.6^{*\Delta}$
E 组			8	$3.2 \pm 0.5^*$	8	$2.0 \pm 0.8^*$

注: * 与 A 组比较 $P < 0.01$; 与 B 组比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\# P < 0.01$

由表 1 可以看出 CFA 接种 3、8、20 周 AA 组大鼠滑膜病理积分均明显高于正常对照组 (P 均 < 0.01)。8 周时羟氯喹组及泼尼松组大鼠关节病理积分均较 AA 组减低 ($P < 0.01$ 、 < 0.05), 两组间差异无显著性。20 周时羟氯喹组及泼尼松组病理积分均较 AA 对照组明显降低减轻 (P 均 < 0.05), 两组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.2 VEGF 的染色结果 :正常对照组大鼠的滑膜组织中仅见少量的 VEGF 阳性细胞, 而在 AA 大鼠滑膜炎症期, 滑膜细胞层及滑膜下层可见大量 VEGF 阳性细胞, 其中主要是滑膜细胞、血管内皮细胞及浸润的单核-巨噬细胞。各组大鼠不同时期滑膜组织中的 VEGF 蛋白表达 (见表 2, 图 1~6)。

表 2 各组大鼠不同时期的 VEGF 阳性细胞百分率 ($\bar{x} \pm s$)

分组	3 周		8 周		20 周	
	只数	%	只数	%	只数	%
A 组	4	5.0 ± 0.8	6	5.2 ± 1.0	6	5.3 ± 0.5
B 组	8	$54.1 \pm 4.1^*$	8	$54.3 \pm 4.0^*$	8	$32.0 \pm 3.5^*$
C 组			8	$20.8 \pm 2.0^{*\Delta}$	8	$13.8 \pm 1.4^{*\Delta}$
D 组			8	$16.4 \pm 1.1^{*\Delta\#}$	8	$14.5 \pm 2.0^{*\Delta}$
E 组			8	$52.6 \pm 3.6^*$	8	$31.5 \pm 3.2^*$

注: * 与 A 组比较 $P < 0.01$; Δ 与 B 组比较 $P < 0.01$; $\#$ 与 C 组比较 $P < 0.01$

2.3 VEGF mRNA 表达 :见图 7。通过 RT-PCR 检测, VEGF 的转录产物为 432 bp, 不同时期各组的滑膜组织中 VEGF mRNA 表达的阳性率见表 3。

表 3 各组大鼠不同时期的 VEGF mRNA 表达阳性率 (%)

分组	3 周		8 周		20 周	
	只数	%	只数	%	只数	%
A 组	4	0	6	17	6	0
B 组	8	88*	8	100*	8	75*
C 组			8	88*	8	13 Δ
D 组			8	25 $\Delta\Delta\#$	8	13 Δ
E 组			8	100*	8	75*

注: * 与 A 组比较 $P < 0.01$; Δ 与 B 组比较 $P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; $\#$ 与 C 组比较 $P < 0.05$

3 讨 论

AA 是研究 RA 常用的一种实验动物模型,其机制是佐剂中的结核杆菌 65 000 热休克蛋白与软骨的蛋白多糖桥连蛋白抗原成分同源,通过分子模拟或交叉反应,引起自身免疫反应,表现为多发性外周关节炎,关节局部红肿,严重致关节畸形。病理变化为增生性滑膜炎,关节软骨破坏、骨侵蚀,关节腔内有炎性细胞浸润。这些临床表现及实验室指标与人 RA 密切相关,是筛选和研究治疗 RA 药物的较理想模型^[2]。

近十几年来,有些风湿病专家早期及联合应用缓解病情的抗风湿药(DMARDs)治疗类风湿关节炎^[3],并取得了一定疗效。其中作为传统的抗疟药的羟氯喹,不同于其他 DMARDs,它少有骨髓抑制和增加感染的副作用,毒性最小,长期耐受性及安全性好^[4],但其治疗类风湿关节炎的作用机制尚未完全阐明。

VEGF 是内皮细胞的特异性有丝分裂原^[5],可促进内皮细胞增生,参与血管分化和生成^[6],提高血管通透性,促使炎性细胞渗出,刺激血浆纤维蛋白原等外渗并沉积于细胞外基质,为新生毛细血管网的形成提供基础。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^[7]。

本研究发现在 AA 不同的病变阶段,滑膜组织中 VEGF 蛋白及基因表达的程度不同。在接种 CFA 3 周后滑膜呈明显炎性浸润,滑膜层及滑膜下层有大量的 VEGF 阳性细胞,滑膜组织 VEGF 蛋白及 mRNA 表达均明显高于正常对照组($P < 0.01$)。8 周后 AA 对照组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,泼尼松组明显下降($P < 0.01$),而羟氯喹组则无明显下降,二者差异有显著性($P < 0.05$)。20 周时,AA 对照组大鼠关节炎反复复发,AA 大鼠滑膜组织部分纤维化,但仍有部分滑膜组织持续细胞增生及炎性浸润,此期的 VEGF 蛋白及 mRNA 表达仍明显高于正常对照组($P < 0.05$),而泼尼松组和羟氯喹组大

鼠滑膜组织中 VEGF 蛋白及 mRNA 表达均明显减少($P < 0.05$)。各阶段 VEGF 阳性表达细胞百分率与关节病理积分均呈正相关关系。我们得出结论:① 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的单核巨噬细胞等起作用,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;② 羟氯喹与泼尼松均可抑制滑膜组织中 VEGF 蛋白及 mRNA 的表达,因而发挥抗炎作用,羟氯喹比泼尼松起效慢,但作用持久,二者的远期治疗作用相同。

(本文图 1~7 见插页第 10-2 页)

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. *Immunol Invest*, 1993, 22: 257-265
- 2 戴冽, 汤美安, 郑军华, 等. 大鼠佐剂性关节炎的诱导及观察指标比较. *中国免疫学杂志*, 2002, 18: 140-141.
- 3 Bresnihan B. Treating early rheumatoid arthritis in the younger patient. *J Rheumatol*, 2001, 62(Suppl): 4-9.
- 4 Tsakonas E, Fitzgerald AA, Fitzcharles MA, et al. Consequences of delayed therapy with second-line agents in rheumatoid arthritis: a 3 years follow-up on the hydroxychloroquine in early rheumatoid arthritis(HERA) study. *J Rheumatol*, 2000, 27: 623-629.
- 5 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 1989, 246: 1306-1309.
- 6 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995, 376: 62-66.
- 7 Lopez JJ, Laham RJ, Stampler A, et al. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res*, 1998, 40: 272-281.

(收稿日期: 2003-04-01)

(本文编辑: 张跃)

系统性红斑狼疮伴肺间质病变支原体感染的临床研究

潘解萍 陆亚华 马英淳

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)伴肺间质病变(interstitial lung disease, ILD)的发病机制尚未十分清楚。为了了解支原体感染与 SLE 伴 ILD 的相关关系,我们采用套式聚合酶链反应(nPCR)检测患者血清、眼、咽、尿道分泌物中的人型支原体(Mh)及解脲支原体(Uu)DNA,并对阳性产物进行 DNA 序列测定,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组 110 例 SLE 患者均来源于 2000 年 3 月至 2003 年 1 月我院免疫风湿科住院病例,资料完整。SLE 诊断标准及 SLE 活动指标按内科学标准^[1]。女性 102 例,男性 8 例,年龄最小 15~68 岁,平均 37.5 岁。病程 0.5~22 年,平均 7.9 年。SLE 活动期 76 例, SLE 稳定期 34 例。26 例正常对照者均为本院健康医务人员。女性 20 例,男性 6 例,年龄 18~55 岁,平均 35.5 岁。

1.2 方法

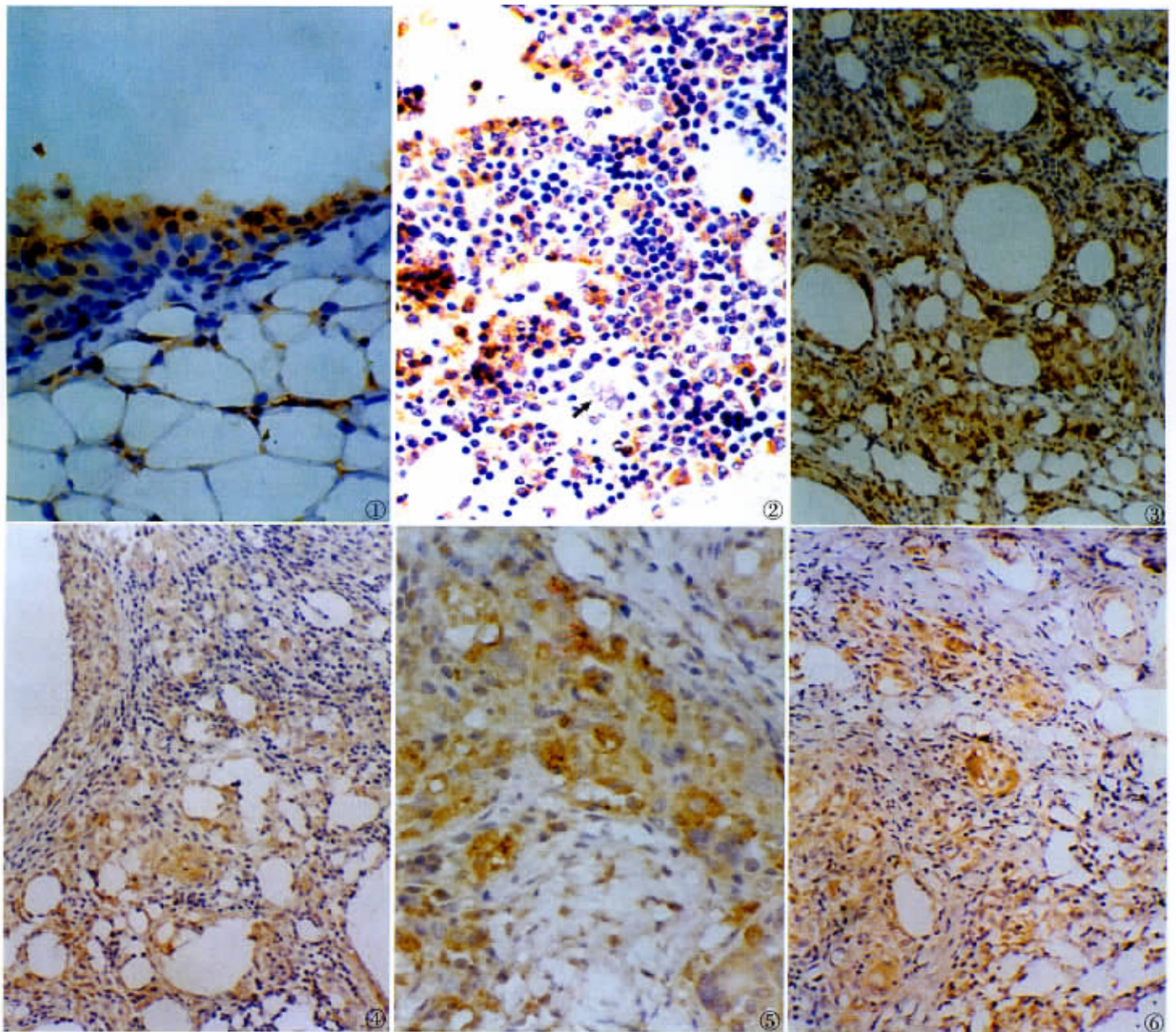


图 1 对照组滑膜组织 VEGF 蛋白表达 DAB×400 图 2 3 周模型组滑膜组织 VEGF 蛋白表达 DAB×400 (箭头所指为多核巨细胞) 图 3 8 周模型组滑膜组织 VEGF 蛋白表达 DAB×200 图 4 8 周羟氯喹组滑膜组织 VEGF 蛋白表达 DAB×200 图 5 20 周 AA 对照组滑膜组织 VEGF 蛋白表达 DAB×400 图 6 20 周羟氯喹组滑膜组织 VEGF 蛋白表达 DAB×200 图 7 VEGF mRNA 的表达情况(3:VEGF β -actin;4:对照组;1,5:marker,6,7 模型组)



插图 10-2