

PEDF 在类风湿关节炎滑膜组织中的表达及临床意义

潘 昉 祝丽华 王 倩 孙 巍 贾会欣

(大庆市油田总医院中医风湿科 黑龙江 大庆 163500)

摘要 目的 研究类风湿关节炎患者滑膜组织中色素上皮衍生因子(Piment epithelial-derived factor, PEDF)的表达情况。方法:采用免疫组化法,检测 30 例类风湿关节炎活动期膝关节滑膜组织中 PEDF 蛋白表达,以 16 例退行性关节炎患者、16 例正常人及该 30 例患者治疗后(稳定期)关节滑膜组织中 PEDF 蛋白作对照,进行对比分析。结果:PEDF 在类风湿关节炎患者明显低于正常人、退行性关节炎患者滑膜组织中的表达,在活动期滑膜组织中的表达明显低于稳定期,组间比较,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。结论:PEDF 与类风湿关节炎的疾病过程密切相关,针对色素上皮衍生因子的靶点治疗有望成为类风湿关节炎治疗的新的方向及策略。

关键词 类风湿关节炎 滑膜组织 色素上皮衍生因子

中图分类号 R593.31 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 17-3287-02

Expression and Clinical Significance of PEDF in Rheumatoid Arthritis Synovium

PAN Fang, ZHU Li-hua, WANG Qian, SUN Wei, JIA Hui-xin

(Department of Rheumatism in Traditional Chinese Medicine, Daqing Oilfield General Hospital, Daqing 163500, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression of piment epithelial-derived factor (PEDF) in human rheumatoid arthritis synovium.

Methods: Expression of PEDF protein was detected by immunohistochemistry in 30 cases of active rheumatoid arthritis synovium, that after treatment, 16 patients with retrograde arthritis and 16 normal subjects as controls. **Results:** In the experimental group, the PEDF expression was significantly lower than in normal subjects and patients with retrograde arthritis. In the experimental group, PEDF expression was also significantly lower than in the patients after treatment. There was statistical difference between experimental group and control groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** PEDF expression is closely related to the progression of rheumatoid arthritis. It's a new direction to be expected that piment epithelial-derived factor may be the target treatment of rheumatoid arthritis treatment.

Key words: Rheumatoid arthritis; Synovium; Piment epithelial-derived factor

Chinese Library Classification(CLC): R593.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 17-3287-02

前言

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜炎为特征的自身免疫性疾病^[1],虽然国内外学者多年来做了大量的基础、临床研究,但其发病原因仍未阐明^[2]。PEDF 作为一种已知最强的抗血管生成因子,其在滑膜血管翳的形成及滑膜炎的病期发展方面日趋成为研究热点。本文就 PEDF 在滑膜组织中的表达情况进行了相关研究,以期临床治疗提供新的方向及策略。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2010 年 5 月至 2011 年 5 月在大庆市油田总医院接受关节镜检查^[3]的患者滑膜组织,选取治疗方案相同的类风湿关节炎患者 30 例,治疗前及治疗后均接受关节镜检查,其中男性 15 例,女性 15 例,年龄 30~64 岁,平均 47 岁,病程 1~20 年,平均 10 年。以 RA 诊断标准(1987 年美国风湿病协会修订)选

定患者。对照组为退行性关节炎患者 15 例,正常人滑膜组织 15 例。滑膜组织蜡块 4 μm 厚连续切片,置于 44℃ 蒸馏水中展片,贴于涂有 APES 防脱片胶的载玻片,60℃ 烤箱烤片后,室温保存,备用免疫组化检测。

1.2 方法

免疫组化法检测 PEDF。将滑膜组织切片按常规依次二甲苯脱蜡,100%~80%梯度酒精水化。3% H_2O_2 室温孵育 10min,以消除内源性过氧化物酶的活性。加入修复液,高压锅高压 2min,起锅冷却至室温。PBS 洗涤 3 次(5min/次),加入一抗(PEDF 1:200),4℃ 冰箱孵育过夜,PBS 洗涤 3 次(5min/次)。加山羊抗小鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体(PEDF),室温孵育 20 分钟,PBS 再次洗涤,DAB 显色。自来水冲洗 10min,苏木素复染,自来水再次冲洗 10min,蒸馏水洗涤,100%~80%梯度酒精水化,二甲苯透明。树胶封片,植入电热鼓风干燥箱中烤片。所用试剂购自北京中杉金桥公司。

1.3 结果判断标准

PEDF 阳性表达表现为细胞浆呈棕黄色颗粒。PEDF 染色结果判定标准 根据阳性细胞所占百分比进行打分。阳性细胞显色 $<5\%$ 为 0 分、5%~25%为 1 分、25%~50%为 2 分、50%为 3 分,0、1 分为阴性(-),2、3 分为阳性(+)

作者简介 潘昉(1978),男,硕士研究生,主治医师,主要从事风湿病的研究,电话:13349502577, E-mail:panfang98@sina.com

(收稿日期 2011-11-09 接受日期 2011-11-29)

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,计数资料用数字表示,采用 χ^2 检验。设定检验的显著性水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

基本资料分析 见表 1

表 1 免疫组化法检测不同组别患者滑膜组织中 PEDF 蛋白的表达情况 (n)

Table 1 Expression of PEDF protein in different groups detected by immunohistochemistry(n)

	RA 治疗前 Before Treatment	RA 治疗后 After Treatment	正常对照组 Normal Subjects	退行性关节炎组 Retrograde Arthritis
阳性 Positive	24	16	14	8
阴性 Negative	6	14	2	8
总计 Total	30	30	16	16

3 讨论

RA 是一种以关节滑膜炎为特征的自身免疫性疾病,严重危及人类健康,并具有高度致残性,病理上的显著特点为滑膜血管增生及弥漫或局部组织炎性细胞浸润,风湿性血管翳在病情发展中逐步形成^[4],最终导致软骨破坏、关节腔破坏^[5]。PEDF 作为已知最强的抗血管形成因子,在风湿性血管翳形成的病理过程中,起到关键调节作用。在大静脉血管及微毛细血管中的实验显示,PEDF 都能够有效地诱导血管内皮细胞凋亡^[6-7],故 PEDF 在体内可抑制血管形成,抑制血管通透性^[8]。新生血管形成对 RA 患者关节滑膜组织中微环境的变化起着关键作用,一方面,为增生的滑膜组织提供充分营养,再刺激滑膜增生,形成恶性循环。另一方面,为弥漫或局部炎性细胞浸润提供平台,并伴有大量炎性介质的释放。部分 RA 患者滑膜组织呈侵蚀性生长,与肿瘤相关炎性因子的释放密切相关,亦离不开它们的血管基础。

Dawson^[9]等首次发现 PEDF 能抑制血管生成刺激因子引起的血管内皮细胞的增值和移动,并证实 PEDF 比其他内源性血管生成抑制剂,如血小板反应蛋白-1、内皮抑素和血管抑素有抗血管生成的活性。Volpert^[10]等研究证明,PEDF 通过作用于 Fas/FasL 介导的细胞凋亡途径抑制新生血管生成。Cai^[11]报道 PEDF 抑制 VEGF 诱导的微血管内皮细胞增生,通过抑制 VEGF 诱导 VEGFR-1 的磷酸化完成的。但 PEDF 抑制血管生成的机制尚未完全阐明^[12]。通过本实验研究,证实了 PEDF 在正常人和退行性关节炎患者滑膜组织中的阳性表达明显高于 RA 患者。比较治疗前后的 PEDF 的阳性表达率,30 例 RA 患者中,治疗后关节滑膜组织 PEDF 阳性表达率较高,有 24 例呈阳性表达,仅有 6 例阴性,明显高于治疗前的 14 例阴性表达,组间比较差异有统计学意义。实验结果提示,PEDF 在 RA 的发生、发展、预后判断都起着关键性作用。

当前对 RA 的治疗主要为控制关节炎症及其它组织的并发症,缓解症状,保持关节功能和防止畸形,及修复受损关节以减轻疼痛和恢复功能^[13-15]。无论积极的手术治疗如滑膜切除术、截骨矫正术、关节融合术,还是药物保守治疗,效果欠佳^[16-17]。关

PEDF 蛋白在正常人、退行性关节炎、RA 患者滑膜组织中的阳性表达分别为 87.5%(14/16)、50%(8/16)、80%(24/30),组间比较,差异有统计学意义 ($\chi^2=14.320, P<0.05$) ;RA 患者治疗后滑膜组织 PEDF 蛋白性表达率为 53.33% (16/30),比较治疗前后的 PEDF 的阳性表达率,差异有统计学意义 ($\chi^2=4.80, P<0.05$)。

节结构破坏包括软骨破坏和关节腔破坏等严重并发症发生几率仍然很高^[18-19],更有部分患者发展成为残疾。通过本实验证实,RA 病情稳定期关节滑膜组织中 PEDF 蛋白阳性表达明显高于活动期,预期 PEDF 可以为早期诊断^[20]及靶点治疗 RA。如通过增加 PEDF 基因或蛋白的表达,或采用 PEDF 局部注射,进而抑制滑膜血管增生及血管翳形成,降低血管通透性,减少血浆蛋白外渗,达到控制滑膜炎症,延缓受损关节呈侵蚀性发展,保护关节软骨免遭破坏,恢复正常功能得目的。

参考文献 (References)

- [1] Carmona L, Cross M, Williams B, et al. Rheumatoid arthritis [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2010, 24(6):733-745
- [2] Curtis JR, Singh JA. Use of biologics in rheumatoid arthritis: current and emerging paradigms of care[J]. Clin Ther, 2011, 33(6):679-707
- [3] Altman RD, Gray R. Diagnostic and therapeutic uses of the arthroscope in rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. Am J Med, 1983, 75(4B): 50-55
- [4] Wang JG, Xu WD, Zhai WT, et al. Disorders in angiogenesis and redox pathways are main factors contributing to the progression of rheumatoid arthritis: a comparative proteomic study[J]. Arthritis Rheum, 2011, 1017, doi: 10.1002/art.33425
- [5] Breedveld FC, Combe B. Understanding emerging treatment paradigms in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(Suppl 1):S3
- [6] Ho TC, Chen SL. PEDF induces p53-mediated apoptosis through PPAR- γ signaling in human umbilical vein endothelial cells [J]. Cardiovasc Res, 2007, 76(2):213-223
- [7] Biyashev D, Veliceasa D, Liao CL, et al. Natural angiogenesis inhibitor signals through Erk5 activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) [J]. Biol Chem, 2010, 285 (18): 13517-13524
- [8] Yang J, Duh EJ, Caldwell RB, et al. Antipermeability function of PEDF involves blockade of the MAP kinase/GSK β -catenin signaling pathway and uPAR expression[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(6):3273-3280

(下转第 3286 页)

的治疗策略之我见[J].新医学,2006,37(6):419-420

Dou Xiao-guang, Li Zhi-wei, Qiao Guang-yan. My opinion of HIV-infected persons and AIDS patients with tuberculosis or hepatitis C treatment strategy[J]. New Chinese Medicine, 2006, 37(6): 419-420

- [10] Tiruneh M. Seroprevalence of multiple sexually transmitted infections among antenatal clinic attendees in Gondar Health Center, northwest Ethiopia[J]. Ethiop Med J, 2008, 46(4):359-366
- [11] Kumar R, Singla V, Kacharya S. Impact and management of hepatitis B and hepatitis C virus co-infection in HIV patients[J]. Trop Gastroenterol, 2008, 29(3):136-147
- [12] G Verucchi, L Calza, R Manfredi, et al. Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Coinfection: Epidemiology, Natural History, Therapeutic Options and Clinical Management [J]. Infection, 2004, 32(1):33-46
- [13] 颜江瑛,郑锡文,张险峰,等.我国某县有偿献血员艾滋病病毒感染者调查[J].中华流行病学杂志, 2000, 21:10-13
Yan Jiang-ying, Zheng Xi-wen, Zhang Xian-feng, et al. The survey of prevalence of HIV infection among paid blood donors in one county in China[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2000, 21:10-13
- [14] 董培玲,张可,吴昊,等.140例成人人类免疫缺陷病毒感染与丙型肝炎病毒感染相互影响[J].临床荟萃,2004,19(2):61-63
Dong Pei-ling, Zhang Ke, Wu Hao, et al. Clinical study on the interaction of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infected via blood in 140 adults[J]. Clinical Focus, 2004, 19(2):61-63
- [15] Sulkowski MS, Thomas DL. Hepatitis C in the HIV-infected patient [J]. Clin Liver Dis, 2003, 7(1):179-194
- [16] Parboosing R, Paruk I, Lalloo UG. Hepatitis C virus seropositivity in a South African Cohort of HIV co-infected, ARV naïve patients is associated with renal insufficiency and increased mortality [J]. J Med Virol, 2008, 80(9):1530-1536
- [17] Massimo Puoti, Maurizio Bonacini. Liver Fibrosis Progression Is Related to CD4 Cell Depletion in Patients Coinfected with Hepatitis C Virus and Human Immunodeficiency Virus[J]. J Infect Dis, 2001, 183:134-137
- [18] Mark S, Sulkowski MD, David L, et al. Hepatitis C in the HIV-Infected Person[J]. Annals of Internal Medicine, 2003, 138(3):197-208
- [19] 阿不来提·阿不都热合木.3例艾滋病合并慢性丙肝抗病毒治疗疗效观察及文献复习[J].新疆医学, 2010, 40:130-133
A bu lai ti · A bu du er he mu. Three cases of AIDS patients with chronic hepatitis C antiviral therapy observation and review of literature[J]. Xinjiang Medical Journal, 2010, 40:130-133
- [20] Mathews G, Bhagani S. The epidemiology and natural history of HIV/HBV and HIV/HCV co-infections[J]. J HIV Ther, 2003, 8(4):77-84

(上接第 3288 页)

- [9] Dawson DW, Vloper OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis [J]. Science, 1999, 285(5425): 245-248
- [10] Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-simulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor[J]. Nat Med, 2002, 8(4): 349-357
- [11] Cai J, Parr C, Watkins G, et al. Decreased Pigment Epithelium-derived Factor Expression in Human Breast Cancer Progression[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(11 Pt 1):3510-3517
- [12] Torsten Falk, Robert T. The Yin and Yang of VEGF and PEDF: Multifaceted Neurotrophic Factors and Their Potential in the Treatment of Parkinson's Disease[J]. Mol Sci, 2010, doi:10.3390/ijms11082875
- [13] Gough AK, Foo J. Current treatment of rheumatoid arthritis[J]. BMJ, 2011, 343:d7050
- [14] Scott DL, Hunter J, Deighton C, et al. Treatment of rheumatoid arthritis is good medicine[J]. BMJ, 2011, 343:d6962
- [15] Emery P, Dörner T. Optimising treatment in rheumatoid arthritis: a review of potential biological markers of response [J]. Ann Rheum Dis, 2011, 12, 70(12):2063-2070
- [16] Inam S, Lipworth WL, Kerridge IH, et al. Rethinking the discordance between guidelines and practice in rheumatoid arthritis treatment[J]. Med J Aust, 2011, 10, 17, 195(8):446-447
- [17] Woodrick RS, Ruderman EM, Medscape. Safety of biologic therapy in rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 10, 7(11): 639-652
- [18] Xu S, Wang Y, Lu J, et al. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-induced osteoporosis [J]. Rheumatol Int, 2011, 11, 6, doi:10.3390/ijms22057136
- [19] Macovei L, Ancuța C, Belibou C, et al. Bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis [J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2011, 7-9, 115(3):723-730
- [20] Szodoray P, Alex P. Protein array diagnostics for guiding therapy in rheumatoid arthritis[J]. Mol Diagn Ther, 2011, 10, 1, 15(5):247-254