

· 论 著 ·

光动力疗法对类风湿性关节炎模型增殖细胞核抗原表达的影响

黄乃艳 顾瑛 刘凡光

【摘要】 目的 观察光动力疗法对类风湿性关节炎模型病理及增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达的影响。**方法** LEW 大鼠用 II 型胶原蛋白诱发关节炎 (CIA)。在大鼠出现踝关节红肿后 1 周, 炎症达到高峰时进行光动力疗法 (PDT) 治疗。一侧作为治疗组, 另一侧作对照组。治疗方法是大鼠麻醉后每公斤体重尾静脉注入 HMME 10 mg, 20 min 后对踝关节进行激光照射, 波长 627.8 nm, 功率密度 100 mW/cm², 能量密度 100 J/cm²。治疗后 2 周, 取关节进行病理及 PCNA 免疫组化染色观察。**结果** PDT 治疗组滑膜增生、血管翳形成及软骨破坏、骨破坏和总的病理评分比对照组好; 治疗组 PCNA 阳性细胞减少, 图像分析结果差异有显著性。**结论** PDT 能够减少类风湿性关节炎模型增生滑膜细胞的数量, 减轻软骨和骨的破坏; 同时使 PCNA 阳性细胞减少。

【关键词】 关节炎, 类风湿; 光化学疗法; 增殖细胞核抗原

The effect of photodynamic therapy on PCNA in the animal model of rheumatoid arthritis HUANG Naiyan*, GU Ying, LIU Fanguang. * Department of Laser Medicine, The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of photodynamic therapy (PDT) on histopathologic changes and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in the animal model of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The rats with collagen-induced arthritis (CIA) were injected intravenously with HMME at a dose of 10 mg/kg when the inflammatory reaction reached its peak in both ankles of these animals. Twenty minutes after the injection, one of the ankles was then randomly assigned to receive laser irradiation at a dose of 100 J/cm² for 1 000 s, while the contralateral ankle served as the control. The histopathologic changes of the ankle joint and the expression level of PCNA were assessed after two the weeks of the treatment. **Results** Histological examination showed statistically significant reductions in synovial hyperplasia, pannus formation and cartilage erosion as well as bone destruction in the PDT treated ankles than those in the contralateral side of these animals. The number of PCNA positive cells was obviously less than that in the control side. Image analysis also confirmed these beneficial effects of PDT. **Conclusion** PDT is useful for reducing synovial hyperplasia, cartilage erosion and bone destruction in CIA and helpful for reducing the PCNA positive cells.

【Key words】 Arthritis, rheumatoid; Photochemotherapy; Proliferating Cell nuclear antigen

光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 能够减轻类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的滑膜增生, 但其机理尚不明确。既往研究发现 PDT 既可使细胞坏死, 也可诱发凋亡^[1], 本实验室还发现了 PDT 作用后兔平滑肌增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达减少, 说明 PDT 的治疗作用可能存在复杂的机制。本研究以 II 型胶原蛋白诱导的大鼠关节炎为对象, 观察光动力疗法对类风湿性关节炎模型 PCNA 表达的影响。

材料与方法

一、实验材料与仪器

1. 主要试剂

酸性可溶性 II 型胶原蛋白 (美国 Sigma 公司); 小鼠抗大鼠 PCNA 单克隆抗体及免疫组化染色 SP 试剂盒 (北京中山生物技术有限公司); 血卟啉甲醚 (HMME 10 mg/ml) (第二军医大学五二三药物研究室)。

2. 主要实验仪器

金蒸气激光器 (北京中科院电子所)。

3. 实验动物

LEW 大鼠 15 只, 均为雌性, 体重 100 ~ 150 g (由中科院动物所提供)。

二、方法

1. 大鼠关节炎模型制作方法^[2]: 酸性可溶性 II 型胶原蛋白 (C-1188) 在 4 ℃ 条件下充分溶解于 0.05 mol/L 的冰醋酸, 浓度为 5 mg/ml, 与等量的福氏完全佐剂混匀, 使抗原呈白色霜状。雌性 LEW 大鼠 15 只, 适应性喂养 2 周后, 腹腔注入 3.5% 的水合氯醛

(每公斤体重 10 ml)麻醉,背部去毛,每只大鼠分 8 ~ 10 个点皮内注射抗原 0.2 ml (含 II 型胶原蛋白 0.5 mg)。1 周后第二次免疫,方法同上,但胶原蛋白与福氏不完全佐剂混合。

2. 大鼠踝关节激光照射法:大鼠用 3.5% 的水合氯醛麻醉后,治疗关节去毛。由尾静脉注入 HMME (每公斤体重 10 mg),20 min 后踝关节行激光照射,光斑覆盖整个踝关节正外侧面。激光波长 627.8 nm,脉冲输出,频率 5 000 ~ 6 000 Hz,激光功率密度 100 mW/cm²,照射时间 1 000 s。

3. PCNA 免疫组化检测步骤:常规脱蜡,3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶后,微波修复抗原,用正常羊血清封闭;倾去血清,滴加小鼠抗大鼠 PCNA 单克隆抗体,稀释比例为 1:1 000,37℃ 孵育 2 h,滴加生物素化二抗工作液、辣根酶标记链霉卵白素工作液,最后用 DAB 显色、复染、封片。细胞核染为棕黄色者为阳性细胞。实验中以 TBS 代替一抗作为阴性对照。

三、实验分组及实验步骤

LEW 大鼠 15 只,用 II 型胶原蛋白诱发关节炎。在第二次免疫后 15 ~ 25 d,大鼠出现踝关节红肿,1 周后红肿达到高峰,此时对大鼠进行 PDT 治疗。选用双侧踝关节发病的大鼠 12 只,一侧踝关节作为治疗组,另一侧作自身对照组。治疗后避光喂养 72 h。2 周后过量麻醉处死大鼠,取踝关节作病理及免疫组化检测。

四、结果处理

PCNA 检测结果用 Image-Pro 图像分析软件分析,指标有面密度 (PerArea) 及阳性细胞核的平均光密度值 (IOD)。面密度是阳性染色的面积总和与统计视野面积的比值,代表阳性细胞的量。光密度是阳性染色处的透光率,表示阳性染色的程度。在本实验中,取光密度尽量一致,代表两组细胞的染色深浅一致、图像分析对阳性细胞的判断标准一致。每张图片取 5 个视野。统计分析采用 SAS 软件作显著性检验。

结 果

一、关节病理结果

对大鼠治疗组和对照组踝关节的病理观察,可以见到对照组滑膜增生达 6 ~ 10 层,呈绒毛状,形成血管翳,增生的血管翳侵蚀骨和软骨,滑膜下大量炎性细胞浸润。而 PDT 治疗组的关节滑膜层数较少,多为 2 ~ 6 层,有的血管翳覆盖于软骨上,但软骨没有破坏。以滑膜下炎症、滑膜增生、血管翳形成及软骨破坏、骨破坏 4 项指标对关节病理进行评分的结果见表 1。从统计学分析结果可以看出,治疗组和对照组在滑膜增生、血管翳形成及软骨破坏、骨破坏和总分上差异都有显著性意义。

二、大鼠踝关节 PCNA 染色结果

对两组大鼠踝关节进行了免疫组化染色观察 PCNA 的表达,结果可见对照组有大量的 PCNA 阳性细胞,PCNA 在绒毛状增生的滑膜和已形成的血管翳中有大量表达,并有 PCNA 阳性的血管翳侵蚀软骨和骨组织,骨表面边界不清,呈溶骨现象。而治疗组 PCNA 阳性细胞较少,只在增生的滑膜细胞表层有少量阳性细胞。对 PCNA 染色结果进行了图像分析 (表 2)。从统计分析结果上看,治疗组和对照组面密度的差异有显著性,对照组大于治疗组。两组光密度差异无统计学意义,说明 PCNA 的阳性染色程度一致。

表 1 治疗组和对照组病理评分表 ($\bar{x} \pm s$)

分组	滑膜下炎症	滑膜增生	血管翳形成及软骨破坏	骨破坏	总分
治疗组	1.17 ± 0.39	1.50 ± 0.52	1.00 ± 0.60	0.08 ± 0.29	3.67 ± 1.30
对照组	1.42 ± 0.51	2.00 ± 0.00	1.67 ± 0.49	1.17 ± 0.58	6.52 ± 1.06
Z 值	-1.282	-2.730	-2.544	-3.885	-3.641
P 值	0.1998	0.0063	0.011	0.0001	0.0003

注:统计学方法为秩和检验

表 2 治疗组和对照组 PCNA 图像分析结果

分组	面密度	光密度
治疗组	0.0257 ± 0.0173	0.2252 ± 0.1112
对照组	0.0817 ± 0.0689	0.2674 ± 0.1858
t 值	2.5227	1.0796
P 值	0.045	0.322

注:统计学方法为 t 检验

讨 论

一、动物模型的选择

在类风湿性关节炎的多种动物模型中,由 David E. Trentham 创立于 70 年代的 II 型胶原诱导的关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 模型是较为常用的一种,在动物皮内注入 II 型胶原后,抗体的产生使其出现关节炎,而关节炎的持续与 T 细胞对 II 型胶原酶解片段 CB11 的反应有关,这与人的 RA 类似^[3]。另一个相同点是 CIA 具有遗传学特征,其易感性与人类相似,由 II 类 MHC 基因决定,因此,其发病率在不同种系的大鼠中有明显差异。为了提高发病率、保证模型的均一性,本研究选用 LEW 大鼠来制作 CIA 模型。LEW 大鼠具有 RT1^l 基因,是对 CIA 敏感的种系,用 II 型胶原诱导关节炎发病率较高、病情重。我们在预实验中观察到发病率达 84%,与 Larsson 等的报道相符^[4]。而且发病大鼠的双侧踝关节红肿程度和病理改变一致,差异无统计学意义 (数据未列出),保证了实验中自身对照的可靠性。

二、PDT 治疗 RA 的原理

RA 的炎性滑膜生长活跃,代谢旺盛且有生长相

对无止境和具有侵袭性的特点,类似肿瘤组织。研究表明滑膜细胞能摄取较多的光敏剂,因而成为 PDT 的靶点。根据国外学者的研究,动物模型的关节炎滑膜比周围组织摄取更多光敏剂,经激光照射后,滑膜出现坏死,周围正常组织特别是软骨组织无明显损害^[5,6]。本实验结果表明,PDT 对大鼠踝关节的病理改变有一定的疗效,使增生滑膜减少,软骨和骨的破坏有明显的改善,特别是骨的破坏更少。

三、PCNA 的结果分析

细胞核增殖抗原是分子量 36kDa 的一种酸性核蛋白,是 DNA 聚合酶 δ 的一种辅助蛋白,在 DNA 合成启动中起关键作用。在细胞增殖过程中,DNA 的复制是在 S 期完成,PCNA 作为 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,在 $G_1 \sim S$ 期出现表达,S 期达到高峰^[7]。在真核细胞中,S 期大约 8~10 h 即可完成,随后进入 G_2 期。因此,PCNA 的表达与细胞增殖状态相关,是一种易于检测的判断细胞增殖状态的指标^[8]。

RA 的关节滑膜增生活跃,许多研究表明滑膜细胞 PCNA 有表达^[9],阳性率达 30% 以上,与非 RA 的滑膜相比,其阳性细胞数明显增多。滑膜细胞的自身分裂是造成滑膜增生、血管翳形成的重要原因。因此,我们选择 PCNA 作为滑膜活性状态和破坏能力的指标,观察 PDT 是否能够对滑膜增殖状态有抑制作用。

实验结果表明,PCNA 的表达在 PDT 治疗后有明显的降低,仅在滑膜的表面有少量的阳性细胞。分析其原因,可能有两个方面:①PDT 诱导了部分滑膜细胞的死亡,导致滑膜细胞数减少,因而 PCNA 阳性细胞也减少。②滑膜细胞在 PDT 作用后数量减少,由于此导致其分泌的细胞因子亦相应减少,使剩余的滑膜细胞增殖活性降低,处于 G_0 期的细胞增加,PCNA 阳性细胞进一步减少。

综上所述,PDT 作用于大鼠关节炎模型后,使关节增生滑膜减少,骨和软骨破坏减轻,PCNA 阳性细胞减少,有利于炎症的缓解和关节的保护。PDT 使 PCNA 阳性细胞减少的实验未见报道,进一步的原因尚待研究。

参 考 文 献

- 1 Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, et al. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L1578Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res*, 1991, 51: 5993-5996.
- 2 Goodfellow RM, Williams AS, Levin JL, et al. Soluble complement receptor one (sCR1) inhibits the development and progression of rat collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol*, 2000, 119: 210-216.
- 3 Cremer MA, Kang AH. Collagen-induced arthritis in rodents: a review of immunity to type II collagen with emphasis on the importance of molecular conformation and structure. *Int Rev Immunol*, 1988, 4: 65-81.
- 4 Larsson P, Kleinau S, Holmdahl R, et al. Homologous type II collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Rheum*, 1990, 33: 693-701.
- 5 Trauner KB, Gandour-Edwards R, Bamberg M, et al. Photodynamic synovectomy using benzoporphyrin derivative in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis. *Photochem Photobiol*, 1998, 67: 133-139.
- 6 Trauner KB, Gandour-Edwards R, Bamberg M, et al. Influence of light synovectomy in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis. *Lasers Surg Med*, 1998, 22: 147-156.
- 7 Fairman MP. DNA polymerase delta/PCNA: action and interaction. *J Cell Sci*, 1990, 95: 1-4.
- 8 戴冽,叶志强,汤美安,等. 类风湿关节炎滑膜巨噬细胞来源的研究. *中华风湿病学杂志*, 2000, 4: 103-105.
- 9 Qu Z, Garcia CH, O'Rourke LM, et al. Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. *Arthritis Rheum*, 1994, 33: 212-220.

(收稿日期:2001-09-07)

(本文编辑:熊芝兰)

新春贺岁

带着您的重托,带着您的期盼,继第 1 期之后,我们又如期将合刊后的 2002 年第 2 期《中华物理医学与康复杂志》送抵您的案头。我们谨以此刊作为新春的贺礼,祝您家庭幸福,事业辉煌,万事如意!

在此,我们衷心感谢各界同仁为本刊顺利出版所做出的巨大贡献,并希望您能一如既往地关心、爱护和支持我们,踊跃赐稿予我们并订阅我们的杂志,使我们能在提高杂志的办刊质量、扩大杂志的读者与作者覆盖面以及增强杂志的广告业务等方面更上层楼。

尊敬的读者,我们热切期待着您的关注。

《中华物理医学与康复杂志》编辑部