

• 实验研究 •

# 反义 VEGF 165 基因关节腔注射抑制大鼠胶原性关节炎形成的病理观察

## Inhibition of rheumatoid arthritis by adenovirus mediated antisense VEGF165 gene injection into joint cavity in rats

王建华<sup>1</sup>, 黄华杨<sup>1</sup>, 尹庆水<sup>1</sup>, 刘延龄<sup>2</sup>, 黄盛东<sup>2\*</sup>

(1. 广州军区广州总医院骨科, 广州 510010; 2. 第二军医大学长海医院胸心外科实验室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的: 观察反义血管内皮生长因子(VEGF)165 基因体内转染对大鼠类风湿性关节炎形成的影响。方法: Wistar 大鼠 30 只, 关节炎诱导 2 周后随机等分为 3 组, 并分别给予相应处理: A 组(关节腔注射 100  $\mu$ l 生理盐水)、B 组(关节腔注射 100  $\mu$ l 空病毒载体)和 C 组(关节腔注射 100  $\mu$ l 反义 VEGF165 重组腺病毒); 4 周后处死大鼠, 对关节炎的发病情况、病理评分、X 线放射学评分结果进行对比研究。结果: 给药 4 周后, C 组大鼠的关节肿胀程度明显轻于 A、B 组; C 组的病理评分低于 A、B 组; 藏红花红染色显示 C 组关节软骨多糖破坏轻于 A、B 组。结论: 腺病毒介导的反义 VEGF 基因转染可以有效地减轻胶原性关节炎的症状, 减轻滑膜血管翳对关节软骨的破坏和病理改变。

**[关键词]** 腺病毒载体; 反义基因; 血管内皮生长因子; 类风湿性关节炎

**[中图分类号]** R 593.22 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0099-02

滑膜血管翳的形成是类风湿性关节炎病理改变的重要特征。如果能够抑制血管翳的形成就有可能阻止类风湿性关节炎的病变发展, 对关节炎产生一定的预防和治疗作用。我们成功制备了反义血管内皮生长因子(VEGF)165 重组腺病毒载体, 并在体外培养的关节炎大鼠滑膜细胞中进行了转染和表达<sup>[1]</sup>。实验发现重组腺病毒可以有效抑制滑膜细胞 VEGF 蛋白的表达。本实验拟通过体内基因转染的方法观察反义 VEGF 基因对大鼠关节炎形成的影响, 探讨类风湿性关节炎的反义 VEGF 基因疗法。

### 1 材料和方法

**1.1 动物分组与处理** 成年雄性 Wistar 大鼠 50 只, 体重(150 $\pm$ 30) g。II 型胶原溶液致敏 2 周后选择成功诱导为胶原性关节炎大鼠的 30 只作为实验动物。动物入选标准为: 出现典型的关节红肿、关节疼痛、活动量减少等症状。实验动物随机等分为 3 组, 用 100  $\mu$ l 微量注射器分别进行后足关节内注射(其中 A 组关节注射 100  $\mu$ l 生理盐水, B 组关节注射 100  $\mu$ l 空载体病毒, C 组关节注射 100  $\mu$ l 反义 VEGF165 腺病毒)后放回笼中饲养, 每隔 1 周, 用自制的足体积测量器检测包括踝关节在内的全足体积。4 周后各组大鼠全部处死, 将包括踝关节的全足取下, X 线摄片后用 10% 甲醛溶液固定 24 h, 置于 10% 的甲酸脱钙液中脱钙 14 d。脱钙过程中用大头针针刺法检测脱钙程度, 待脱钙完全将关节纵向剖开, 石蜡包埋, 切片, 分别进行 H-E 和藏红花红染色。

**1.2 关节炎病理评分** 参照文献[2]方法, 低倍镜下观察胫距、跟距、距舟 3 个关节, 每一关节根据炎症渗出情况、滑膜血管翳形成情况、关节软骨及软骨下骨破坏情况分别进行评分。评分标准: 无(0 分), 轻(1 分), 中(2 分), 重(3 分)。3 个关节评分之和为关节炎总积分。

**1.3 关节软骨蛋白多糖染色** 采用藏红花红对组织切片进行染色, 观察关节面蛋白多糖的丢失情况, 反映血管翳对软骨的破坏程度。

### 2 结果

**2.1 大体观察** 致敏 2 周后, 各组大鼠关节肿胀, 关节炎形成。关节腔注射后, C 组大鼠关节肿胀程度明显轻于 A、B 两组( $P < 0.05$ , 图 1)。

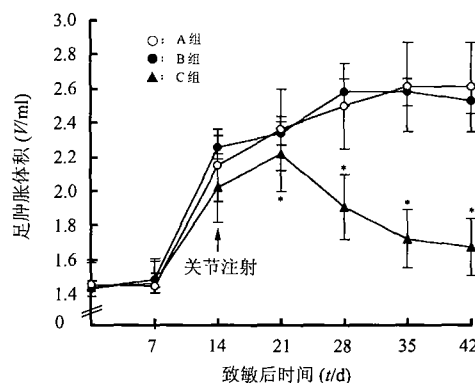


图 1 关节腔注射不同液体对大鼠足爪肿胀的影响

\*  $P < 0.05$  与 A 组和 B 组比较,  $n = 5$

**2.2 病理观察及评分** 病理切片显示: A、B 两组的关节间隙有丰富的滑膜组织增生和血管翳形成, 关节面软骨受血管翳侵蚀破坏; C 组的滑膜增生程度较轻, 软骨面较光整(图 2)。蛋白多糖染色(图 3)显示: A、B 两组关节软骨多糖丢失明显, C 组蛋白多糖少量丢失, 软骨关节面较光滑。病理评分结果: A 组(21 $\pm$ 3.4)分, B 组(23 $\pm$ 3.7)分, C 组(9 $\pm$ 1.5)分, C 组明显低于 A、B 两组( $P < 0.05$ )。

**[基金项目]** 广东省卫生厅科研基金(A2003589)。

**[作者简介]** 王建华(1973-), 男(汉族), 博士, 主治医师。

E-mail: jianhuawangdr@sina.com.cn

\* Corresponding author. E-mail: shendonghuangdr@yahoo.com.cn



图2 关节炎大鼠反义 VEGF165 基因治疗前后的病理改变(H-E, ×40)

A、B: 盐水对照组(A)和空载体组(B)关节间隙大量滑膜血管翳形成, 关节软骨破坏较明显;  
C: 反义基因治疗组滑膜增生较轻, 软骨面光滑平整

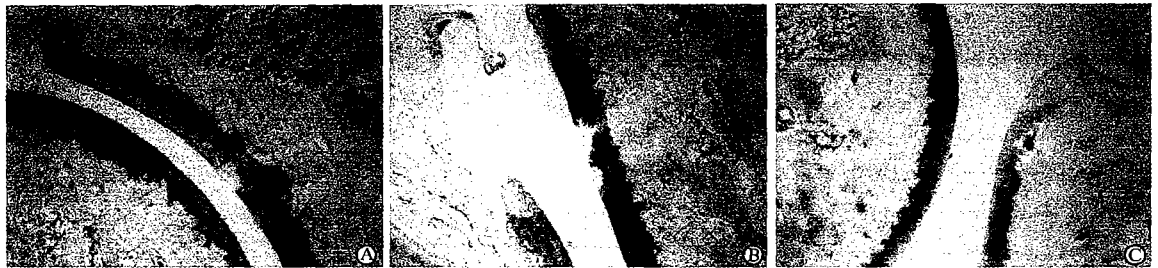


图3 关节炎大鼠反义 VEGF165 基因治疗前后蛋白多糖的改变(藏红花红染色, ×100)

A、B: 盐水对照组(A)和空载体组(B)关节软骨表面有软骨剥脱, 蛋白多糖丢失;  
C: 反义基因治疗组关节面光滑平整, 蛋白多糖丢失不明显

### 3 讨论

类风湿关节炎是一种与遗传因素有关的、病因不明的自身免疫性疾病。该病发病率高,对人类健康危害大,目前尚无一种十分有效的治疗方法。药物疗法是目前最常用的治疗方法,各种药物虽然能够一定程度缓解症状,但不良反应大,疗效欠佳。

反义基因疗法又称为基因封闭疗法,它是 Izant 等<sup>[3]</sup>在 1984 年提出的概念,主要用于抑制肿瘤基因的表达,其基本原理是:通过基因转移手段向靶器官或组织导入一种外源性基因序列,该外源性基因序列可与靶基因互补结合,抑制靶基因的表达,从而治疗疾病。目前开展的反义治疗技术主要有反义寡核苷酸疗法及载体介导的反义基因转移疗法。

滑膜血管增生、血管翳的形成被认为是类风湿关节炎的重要特征。血管翳是一种炎性增生的滑膜组织,它对周围组织具有很强的侵蚀性和破坏性,它是类风湿关节炎关节软骨遭受破坏的病理基础。大量研究证实 VEGF 是在滑膜血管翳中高度表达促进血管翳的形成并维持其生物状态的重要生物因子<sup>[4]</sup>,并有实验证实向关节腔注射 VEGF 抗体或其受体拮抗剂可以明显减轻关节炎的症状,抑制血管翳的形成<sup>[5、6]</sup>。我们在前期体外实验观察发现,反义 VEGF 腺病毒感染培养的滑膜细胞,可以有效抑制滑膜细胞表达和分泌 VEGF 蛋白<sup>[1]</sup>。所以我们将 VEGF 作为抑制滑膜血管翳形成的反义治疗靶基因。

本实验将反义 VEGF 腺病毒进行关节腔注射初步观察后发现:反义基因注射组的关节肿胀较对照组轻,关节病理评分低于对照组。提示反义 VEGF 基因可能通过对 VEGF 基因表达的封闭作用达到抑制类风湿关节炎滑膜血管翳的

形成,减轻血管翳对关节软骨的破坏作用。其组织中 VEGF 基因表达情况尚需进一步的实验证实,其表达强度、时间、在体表达的量效关系等尚需继续探讨。

### [参考文献]

- [1] 王建华,吴岳嵩,黄盛东,等.反义 VEGF 腺病毒的制备及其对类风湿关节炎滑膜细胞 VEGF 分泌的影响[J].中华风湿病学杂志,2003,7(2):93-96.
- [2] Takayanagi H, Juji T, Miyazaki T, et al. Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(2): 137-146.
- [3] Izant J, Weintraub HH. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis[J]. *Cell*, 1984, 36(7): 1007-1012.
- [4] Lu J, Kasama T, Kobayashi K, et al. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis[J]. *J Immunol*, 2000, 164(11): 5922-5927.
- [5] Grosios K, Wood J, Esser R, et al. Angiogenesis inhibition by the novel VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, PTK787/ZK222584, causes significant anti-arthritic effects in models of rheumatoid arthritis[J]. *Inflamm Res*, 2004, 53(4): 133-142.
- [6] De Bandt M, Ben Mahdi MH, Ollivier V, et al. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor I (VEGF-R I), but not VEGF-R II, suppresses joint destruction in the K/BxN model of rheumatoid arthritis[J]. *J Immunol*, 2003, 171(9): 4853-4859.

[收稿日期] 2004-04-04

[修回日期] 2004-08-20

[本文编辑] 孙岩