

普萘洛尔治疗婴幼儿血管瘤作用机制的动物实验研究

丁 涛,曹东升,谢 娟,李红红,陈增红,朱邦中,鲍 琼,娄 寅

摘要 目的 探讨普萘洛尔对人增生期血管瘤裸鼠种植瘤生长的影响。方法 将手术切除的 1 例儿童增生期血管瘤瘤体组织分切成组织块,分别植入 16 只幼小裸鼠(BALB/c nu/nu)的皮下,每只 4 处。建立人增生期血管瘤裸鼠模型,于第 45 天随机分成两组:普萘洛尔组的每只裸鼠用 0.01% 普萘洛尔溶液 0.4 ml 灌胃,每天 1 次,连续 1 周;给予同样体积的蒸馏水每天 1 次,连续 1 周灌胃作为对照组。密切观察裸鼠及移植瘤体的生长情况并做相应记录,通过免疫组织化学方法以及 Western blot 方法分别检测血管内皮生长因子(VEGF)及胰岛素样生长因子-2(IGF-2)的表达情况。结果 普萘洛尔组裸鼠的肿瘤体积在干预期内明显下降,而对照组瘤体体积增加。使用普萘洛尔后,移植血管瘤 VEGF、IGF-2 蛋白的表达明显减弱。结论 普萘洛尔可以有效地抑制人血管瘤移植瘤生长速度,抑制 VEGF 和 IGF-2 的分泌,从而有效抑制肿瘤血管生成,加速肿瘤转化为消退期。

关键词 血管瘤;普萘洛尔;血管内皮生长因子;胰岛素样生长因子-2

中图分类号 R 739.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1238-04

2008 年法国 Bordeaux 儿童医院的 Léauté-Labrèze et al^[1]在治疗婴幼儿肥厚性心肌病时发现普萘洛尔也可用来治疗婴幼儿血管瘤,由于普萘洛尔治疗血管瘤的疗效显著且并发症较少,目前已成为临床医师治疗较复杂、较严重婴幼儿血管瘤的一线选择,但具体治疗机制尚不统一,该研究以建立的人增生期移植血管瘤裸鼠模型为载体,灌胃给予移植血管瘤裸鼠注射普萘洛尔溶液,检测普萘洛尔干预前后血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及胰岛素样生长因子受体-2(insulin-like growth factor 2, IGF-2)蛋白的表达,观察普萘洛尔对移植血管瘤瘤体内 VEGF 及 IGF-2 表达的影响,进一步探讨普萘洛尔治疗血管瘤的可能

发生机制。

1 材料与方法

1.1 裸鼠人血管瘤种植瘤模型的建立 移植供体血管瘤的来源是 1 例 3 个月男性患儿左肩部增生期巨大毛细血管瘤(基底直径约 7 cm)。无菌条件下手术切除患儿左肩部血管瘤,分为两部分,一部分于福尔马林固定后送病理,另一部分保存于 0 ~ 4 °C 的无菌容器中送 SPF 级动物实验室,无菌条件下去除血管瘤表皮,合理选择皮下组织,分别切成大小约 5 mm × 4 mm × 3 mm 的组织块若干,经皮肤切口移植于 16 只裸鼠双侧胸壁、腰背部皮下组织内,每只 4 处,共 64 处,标本离体 1 h 内完成所有移植工作。瘤体植入完成后待其自然生长,同时定期观察并记录瘤体生长。移植后定期用游标卡尺测量肿瘤最大直径,成瘤标准:皮下结节 $\phi > 0.5$ cm。

1.2 实验动物分组及处理 于瘤体移植后第 45 天将 16 只成瘤后的裸小鼠随机分成两组,每组 8 只:普萘洛尔组的每只裸鼠用 0.01% 普萘洛尔溶液 0.4 ml 灌胃,每天 1 次,连续 1 周;给予同样体积的蒸馏水每天 1 次,连续 1 周灌胃作为对照组。普萘洛尔干预当天及之后的每隔 2 d 测量移植瘤体的最大径(a)和最小径(b),并计算其瘤体体积(公式:体积(V) = $\pi/6ab^2$)。药物干预第 22 天处死裸鼠,分离瘤体,将瘤体组织分为 3 部分,分别保存用于 HE 染色、免疫组化和 Western blot 检测。

1.3 主要试剂 一抗:鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(1:150 稀释)、兔抗人 IGF-2 多克隆抗体(1:150 稀释)、二抗是 PV9000 通用型试剂盒、 β -actin、DAB 显色试剂盒均购于北京博奥森生物技术有限公司。

1.4 VEGF 及 IGF-2 的免疫组化检测及阳性细胞判定 严格按试剂盒说明书进行操作,应用链霉抗生物素蛋白-过氧化酶反应,DAB 显色,苏木精复染,分别设立阳性对照和阴性对照,试剂公司提供的阳性图片为阳性对照,阴性对照为一抗用 PBS 液,并镜检分析其结果。结果鉴定准则:VEGF 及 IGF-2 阳性均表达于血管瘤内皮细胞的胞质内,经免疫组化染色以后胞质内可见较强的棕黄色阳性免疫的反应颗粒。评定标准:在相同的显微镜放大倍率

2014-03-31 接收

基金项目:安徽省科技厅项目(编号:KJ2011Z190)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院整形外科,合肥 230601

作者简介:丁 涛,男,硕士研究生;

曹东升,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,

E-mail:cdsh912@sohu.com

($\times 400$)下观察 随机选取5个高倍视野,镜下以胞质出现黄色、棕黄色、棕褐色颗粒为阳性,每个视野计数以100个血管内皮细胞作为标准,按阳性细胞所占比例进行半定量分级: $< 20\%$ 为(-), $20\% \sim 45\%$ 为(+), $46\% \sim 75\%$ 为(++), $> 75\%$ 为(+++)。

1.5 Western blot 检测 VEGF 及 IGF-2 的表达

普萘洛尔干预后,普萘洛尔组及对照组的离体瘤体分别经匀浆、裂解、离心8 min (1 000 r/min),即得总蛋白提取液,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻备存。步骤:①蛋白电泳:配分离胶、浓缩胶,上样,开始电泳;②转膜: $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 V 恒流电2 h;③印迹:用TBST配制5%脱脂奶粉封闭,洗膜;加一抗工作液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜;加二抗工作液 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,洗膜;④洗片:用0.1% PBST洗膜,Luminol Reagent A液与B液1:1混匀后,随即滴于PVDF膜上,完成压片、曝光、定影;⑤蛋白检测:采用Lab Works 4.5图像获取以及分析系统软件分别测定VEGF、IGF-2蛋白条带的积分光密度(integral optical density, IOD)值,内参照用 β -actin,每个样品均同时检测 β -actin蛋白条带的IOD值,VEGF、IGF-2的相对表达量以 $\text{IOD}_{\text{VEGF}}/\text{IOD}_{\beta\text{-actin}}$ 、 $\text{IOD}_{\text{IGF-2}}/\text{IOD}_{\beta\text{-actin}}$ 值表示。

1.6 统计学处理 应用SPSS 17.0统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间的数据比较用 t 检验;计数资料之间的数据比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 人血管瘤组织移植后瘤体的变化 全部实验用成瘤裸鼠均存活,瘤体移植处皮肤切口愈合良好,无红肿、破溃。所种64处瘤体存活率93.75% (60/64)。瘤体移植后第1~2周基本上没有明显变化;第2~3周时间内瘤体体积增长缓慢,平均直径均大于0.5 cm,达到成瘤标准(图1A),3~5周瘤体体积增长较快。6周时其直径可达1 cm(图1B),移植后第1~6周用游标卡尺测量瘤体最大径(a)和最小径(b)根据公式 $V = \pi/6 \times a \times b^2$ 估算瘤体体积变化,见表1。

表1 移植瘤体体积增长情况($\bar{x} \pm s$)

饲养时间(周)	瘤体体积(cm^3)
1	0.295 ± 0.014
2	0.352 ± 0.026
3	0.517 ± 0.032
4	0.692 ± 0.063
5	0.875 ± 0.096
6	1.043 ± 0.105



图1 移植后瘤体生长情况

A: 移植后第3周瘤体($\phi > 0.5\text{ cm}$); B: 移植后第6周瘤体($\phi > 1.0\text{ cm}$)

2.2 普萘洛尔对裸鼠人血管瘤种植瘤生长的影响

药物干预前,两组裸鼠体重及移植血管瘤瘤体体积差异无统计学意义,于药物干预试验后第22天后处死裸鼠取肿瘤称重,药物干预后普萘洛尔组(含32处种植瘤)瘤组织生长速度明显慢于对照组(含28处种植瘤)($P < 0.05$),见表2、图2。普萘洛尔组移植血管瘤的体积随着注入普萘洛尔后时间的延长和浓度的增加,种植瘤生长越来越小,且呈时间-剂量-效应依赖性。

表2 普萘洛尔对裸鼠人血管瘤种植瘤生长的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	给药前瘤体体积	给药后瘤体体积	瘤体重量
	(cm^3)	(cm^3)	
普萘洛尔	0.78 ± 0.18	$0.42 \pm 0.11^*$	$0.30 \pm 0.13^*$
对照	0.74 ± 0.16	1.75 ± 0.29	1.16 ± 0.14
t 值	0.529	10.381	9.765

与对照组比较: * $P < 0.05$

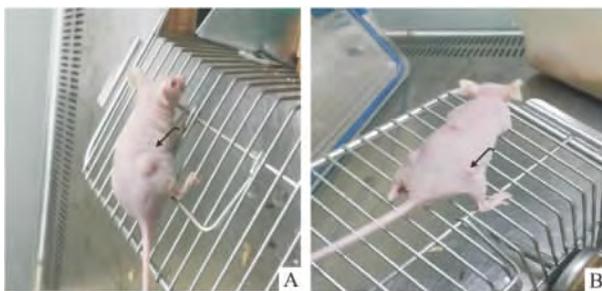


图2 普萘洛尔药物干预前后瘤体生长情况

A: 普萘洛尔药物干预前; B: 普萘洛尔药物干预后

2.3 光镜下组织形态学及免疫组化结果观察 普萘洛尔组瘤体在光镜下观察已失去血管瘤的组织结构,细胞溶解、破碎,有变性的坏死灶,可见脂肪细胞及少量纤维组织(图3A)。而对照组内皮细胞密集,细胞呈条索状或团块状排列,形态大小各异,可见增生的大量毛细血管(图3B)。光镜下($\times 400$)见对照组有明显的VEGF和IGF-2的表达,主要位

于内皮细胞的胞质内,呈棕黄色颗粒,表达较强。而普萘洛尔组则明显下降,VEGF 和 IGF-2 的表达较低,数量减少,颜色变淡(图 3C~3F)。VEGF 在普萘洛尔干预裸鼠人血管瘤种植瘤生长前后的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 33.82, P < 0.05$),见表 3。IGF-2 在普萘洛尔干预裸鼠人血管瘤种植瘤生长前后的表达差异也有统计学意义($\chi^2 = 26.75, P < 0.05$),见表 3。

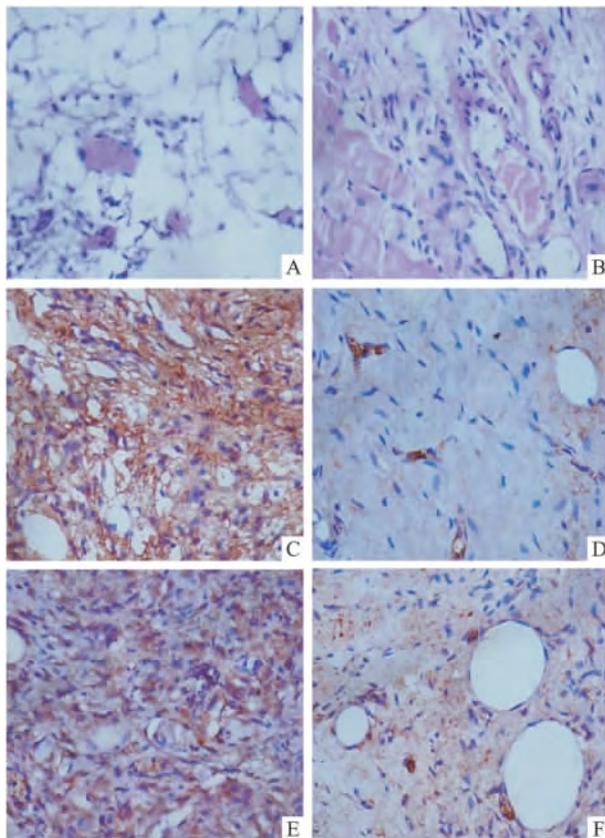


图 3 普萘洛尔药物干预后两组瘤体组织的 HE 染色结果及 VEGF、IGF-2 的表达情况

A:普萘洛尔组 HE 染色 $\times 400$;B:对照组 HE 染色 $\times 400$;
C:对照组 VEGF 在血管瘤组织中高表达 SP $\times 400$;D:普萘洛尔组 VEGF 在血管瘤组织中低表达 SP $\times 400$;E:对照组 IGF-2 在血管瘤组织中高表达 SP $\times 400$;F:普萘洛尔组 IGF-2 在血管瘤组织中低表达 SP $\times 400$

表 3 VEGF 及 IGF-2 在普萘洛尔干预移植瘤体生长前后的表达

组别	n	VEGF					IGF-2				
		-	+	++	+++	阳性率 (%)	-	+	++	+++	阳性率 (%)
普萘洛尔	32	26	4	2	0	18.75*	23	6	3	0	28.13*
对照	28	0	0	10	18	100.00	2	6	14	6	92.86

与对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 Western blot 检测 与对照组比较,经普萘洛尔干预后 VEGF、IGF-2 蛋白表达水平均下降。见图

4、表 4。

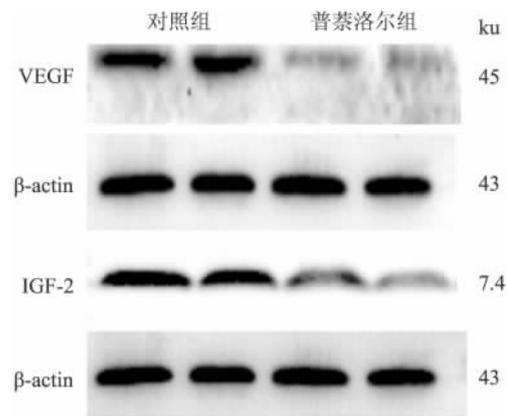


图 4 Western blot 法检测两组 VEGF、IGF-2 蛋白的表达情况

表 4 VEGF、IGF-2 蛋白 Western blot 的 IOD 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF	IGF-2
普萘洛尔	0.24 \pm 0.02*	0.35 \pm 0.01*
对照	0.87 \pm 0.03	0.71 \pm 0.02
t 值	7.136	5.642

与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

普萘洛尔治疗血管瘤的优点主要存在于以下各方面:① 见效迅速;② 疗效显著;③ 副作用较少见。其次,Price et al^[2] 在 2011 年的一篇随机对照研究中指出,普萘洛尔患者平均花费为 \$205,而使用激素类药物治疗的患者平均花费为 \$416。因此,许多研究者认为普萘洛尔可以代替激素类药物作为一线药物治疗血管瘤,改变现有的血管瘤治疗现状^[3]。有研究者分析普萘洛尔及其他治疗方式治疗婴幼儿血管瘤的有效性,发现在人体不同部位的婴幼儿血管瘤治疗中,普萘洛尔治疗的有效性优于激素类药物、激光治疗及长春新碱治疗^[4]。普萘洛尔作为典型的 β 受体阻断剂,主要用于心脑血管疾病的防治,而对作用于血管其他受体或靶点的研究国内外报道较少,但体外研究^[5] 表明,普萘洛尔抑制肿瘤干细胞和胎盘血管内皮细胞的增殖,且是剂量依赖性的。但目前活体内的相应观察资料报道较少。

Picard et al^[6] 发现 IGF-2 与 VEGFR-1 呈正相关性增高,VEGF 可能是 IGF-2 基因表达调控的下游产物,认为 VEGF 与 IGF-2 之间可能存在相关性。有研究^[7] 显示,IGF-1 R 能促进胰腺癌细胞上 VEGF 的表达,在促肿瘤血管新生中起到重要作用。其促

进血管生成的可能机制是:① 诱导缺氧诱导因子-1 α 的合成,后者再促进 VEGF 的转录;② 促进 VEGF(主要是 VEGF-A)及其相应受体(主要为 VEGFR-2)的结合,发挥在下游靶点的酪氨酸磷酸化、NO 产生、细胞 Ca²⁺ 稳定、血管内皮细胞增殖和移行等方面的作用。

由此可以看出 VEGF 和 IGF-2 因子在血管瘤的发生、发展过程发挥着至关重要的作用,尤其是血管瘤的增殖过程。本研究中,在健康的裸鼠体内的移植人增长期血管瘤瘤内,普萘洛尔治疗后应用免疫组化法及 Western blot 法检测 VEGF 和 IGF-2 在血管瘤组织中均呈低表达,而对照组 VEGF 和 IGF-2 在血管瘤组织中均呈高表达,同时观察到经普萘洛尔治疗后移植血管瘤也逐渐消退,表明普萘洛尔能使血管瘤中 VEGF 及 IGF-2 的表达减少。综上所述,普萘洛尔可以有效地抑制人血管瘤移植瘤生长速度,抑制 VEGF 和 IGF-2 的分泌,从而有效抑制肿瘤血管生成,加速瘤体转化为消退期。

参考文献

[1] Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, et al. Pro-

panolol for severe hemangiomas of infancy [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(24): 2649-51.

[2] Price C J, Lattouf C, Baum B, et al. Propranolol vs Corticosteroids for Infantile Hemangiomas [J]. *Arch Dermatol*, 2011, 147(12): 1371-6.

[3] Bertrand J, McCuaig C, Dubois J, et al. Propranolol versus Prednisone in the Treatment of Infantile Hemangiomas: A Retrospective Comparative Study [J]. *Pediatr Dermatol* 2011, 28(6): 649-54.

[4] Lou Y, Peng W J, Cao Y, et al. The effectiveness of propranolol in treating infantile hemangiomas: A Meta-analysis including 35 studies [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2013: [Epub ahead of print].

[5] Zhang L, Mai H M, Zheng J, et al. Propranolol inhibits angiogenesis via down-regulating the expression of vascular endothelial growth factor in hemangioma derived stem cell [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 7(1): 48-55.

[6] Picard A, Boscolo E, Khan Z A, et al. IGF-2 and FLT-1/VEGF-R1 mRNA levels reveal distinctions and similarities between congenital and common infantile hemangioma [J]. *Pediatr Res*, 2008, 63(3): 263-7.

[7] Matthias Neid, Kaustubh D, Susann S, et al. Role of insulin receptor substrates and protein kinase C in vascular permeability factor vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer cells [J]. *Biol Chem* 2004, 279(6): 3941-8.

An experimental study on the mechanism of therapy for hemangioma with propranolol

Ding Tao, Cao Dongsheng, Xie Juan, et al

(Dept of Plastic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To discuss the effect of propranolol on the proliferation of human hemangioma on growth of planting tumor in nude mice. **Methods** Surgery on 1 case of proliferative phase for children strawberry hemangioma tissue fragments made from, respectively, 16 pups in nude mice implanted (BALB/c nu/nu) under the skin on each of 4. Establishment of nude mouse model of human hyperplastic vascular tumor was randomly divided into two groups on the 45th day: In general group of propranolol, propranolol was given with 0.01% solution 0.4 ml after intragastric infusion once a day for a week. In mice of control group, intragastric administration of the same volume of distilled water was given once a day for a week. The growth conditions of the nude mice and transplanted tumors were observed, using the method of immunohistochemistry and Western blot to detect the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and insulin-like growth factor-2 (IGF-2). **Results** Experimental group in nude mice tumor volume in the intervening period was declined significantly, while the tumor size in the control group was increasing. After intragastric administration of propranolol, the expression of VEGF and IGF-2 protein in graft tumor was decreased significantly. **Conclusion** Propranolol can inhibit the growth of human hemangioma growing speed *in vivo* and inhibits the secretion of VEGF and IGF-2. With decreased VEGF and IGF-2 secretion, the tumor angiogenesis is inhibited and the fade transition is accelerated.

Key words hemangioma; propranolol; vascular endothelial growth factor; insulin-like growth factor-2