文章编号:1000-5404(2012)23-2403-05

论著

口服普萘洛尔对婴幼儿血管瘤MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2表达水平的影响

李 铭[1],陈幸生[2],郭志辉[1],谢义德[1],詹明坤[1],周亚宽[1],江成鸿[1],陈小松[1] (350001 福州,福建医科大学附属协和医院:整形外科[1],血管甲状腺外科[2])

[摘要] **目的** 研究口服普萘洛尔前后婴幼儿血管瘤病灶内MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2表达水平的影响。**方法** 选择2010年5月至2011年12月来我院就诊、年龄≤3个月、血管瘤病灶位于肢体或隐蔽部位、家属要求手术治疗却具备单独口服普萘洛尔治疗条件、排除口服普萘洛尔禁忌证、先前未接受过其他任何相关治疗的病例作为研究对象,共39例。经过与家属沟通并征得其书面同意,先按口服普萘洛尔诊疗常规,口服用药前在局麻下夹取血管瘤体组织活检,后口服8周普萘洛尔[剂量:2 mg/(kg·d),分2次,每12小时用药],继而手术切除瘤体。采用免疫组化、实时荧光定量RT-PCR的方法,检测口服用药前后病灶组织内MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2表达水平的变化,计算口服用药前后病灶微血管密度(MVD)。**结果** 免疫组化与实时荧光定量RT-PCR结果均提示,口服普萘洛尔后血管瘤病灶内MVD值明显减低且具有统计学意义($t=18.458$,$P<0.01$),MMP-2、MMP-9表达水平较用药前明显减少($P<0.01$),TIMP-1、TIMP-2表达水平明显增高($P<0.01$)。且口服用药后上述4个因子免疫组化平均积分光密度、mRNA相对表达量变化与MVD值变化密切相关。**结论** 普萘洛尔可下调血管瘤病灶内MMP-2、MMP-9的表达,上调TIMP-1、TIMP-2的表达,从而抑制新生血管的形成。

[关键词] 血管瘤;普萘洛尔;MMP-2;MMP-9;TIMP-1;TIMP-2
[中图法分类号] R732.2; R966; R972 [文献标志码] A

Effect of propranolol on expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in infantile hemangioma

Li Ming[1], Chen Xingsheng[2], Guo Zhihui[1], Xie Yide[1], Zhan Mingkun[1], Zhou Yakuan[1], Jiang Chenghong[1], Chen Xiaosong[1] ([1]Department of Plastic Surgery, [2]Department of Vascular & Thyroid Surgery, Affiliated Fujian Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian Province, 350001, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of propranolol on the expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) in infantile hemangioma. **Methods** Thirty-nine patients (age≤3 months) with proliferative phase of hemangioma in our hospital from May, 2010 to December, 2010 were enrolled. The patients were treated with propranolol for 8 weeks after hemangioma biopsy, and then underwent surgery for hemangioma resection. The mRNA and protein expression levels of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in hemangioma tissues were examined by quantitative real-time RT-PCR and immunohistochemical method, respectively, and the microvessel density (MVD) was calculated before and after propranolol treatment. **Results** The MVD in the hemangioma tissues decreased significantly after propranolol treatment ($P<0.01$). The protein and mRNA expressions of MMP-2 and MMP-9 decreased significantly ($P<0.01$), but the protein and mRNA expressions of TIMP-1 and TIMP-2 increased significantly after propranolol treatment ($P<0.01$). The changes of MVD were closely correlated with the protein and mRNA expression levels of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2. **Conclusion** Propranolol can reduce proliferative hemangioma through down-regulating MMP-2 and MMP-9 expression and up-regulating TIMP-1 and TIMP-2 expression.

[**Key words**] hemangioma; propranolol; MMP-2; MMP-9; TIMP-1; TIMP-2

Supported by the Medical Innovative Foundation of Fujian Province (2012-CX-17) and the Provincial University Project Funded by Fujian Education Department (JK2012020). Corresponding author: Chen Xingsheng, E-mail: rlcxs@yahoo.com.cn

[基金项目] 福建省医学创新课题(2012-CX-17);福建省教育厅资助省属高校项目(JK2012020)
[通信作者] 陈幸生,E-mail:rlcxs@yahoo.com.cn

婴幼儿血管瘤是婴幼儿最常见的良性肿瘤。发病率约10%[1]。其最大特点是病程具有自限性,到5岁前约有50%的患者血管瘤可完全消退,7岁前约70%,到9岁前这一比例可以达到90%[2]。尽管如此,但是其对婴幼儿却存在一些不容忽视的潜在危害。约50%的血管瘤患者在病灶大部分消退后会局部仍会残留毛细血管扩张、瘢痕形成、脂肪瘤等外形损害;增殖迅速的血管瘤还可能发生溃疡、功能障碍或者毁容甚至危及生命;甚至影响孩子的心理健康造成自卑的心理,给患儿及家属造成压力。因此目前仍主张对婴幼儿血管瘤采取适当、有效的治疗措施[3]。选择治疗方案的原则和目的为以尽可能小的代价控制瘤体生长,尤其是不进一步破坏容貌,或形成新的医源性损害。2008年7月,法国Bordeaux儿童医院Léauté-Labréze在新英格兰医学杂志上报道了普萘洛尔对严重婴幼儿血管瘤具有显著的抑制作用[4]。其后又有数篇文献报道了普萘洛尔治疗血管瘤[治疗剂量:2~3 mg/(kg·d)],结果均支持Léauté-Labréze的发现[5-17]。由于普萘洛尔副作用相对较小,应用于儿童至今尚无出现死亡及严重心血管事件并发症的报道,因此迅速成为临床治疗婴幼儿血管瘤的首选方案但其治疗机制尚未完全明确。本研究拟通过测定、比较口服普萘洛尔前后血管瘤病灶内MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2这4个与血管生成密切相关因子表达水平的变化,探讨普萘洛尔在收缩血管、降低局部灌注的同时,是否可同时抑制血管瘤血管内皮细胞增殖,并对其治疗血管瘤的机制作初步研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本治疗及研究经医院医务部及伦理委员会核准。选择2010年5月至2011年12月来福建医科大学附属协和医院整形外科就诊、年龄≤3个月、血管瘤病灶位于肢体或隐蔽部位、家属要求手术治疗却具备单独口服普萘洛尔治疗条件、排除口服普萘洛尔禁忌证(如哮喘等)、先前未接受过其他任何相关治疗的病例作为研究对象。共收集到完整病例39例,其中男性16例,女性23例,年龄最小33 d,最大2个月零3周,年龄(57.62±11.26)d。经过与家属沟通并征得其书面同意,治疗前先按口服普萘洛尔诊疗常规,局部消毒铺巾,用皮肤活检枪在局麻下夹取血管瘤体组织,以6-0可吸收线缝合1针。后口服8周盐酸普萘洛尔片(河南天方药业股份有限公司生产,剂量:2 mg/(kg·d),分2次,每12小时用药),继而手术切除瘤体。

1.2 免疫组化材料

10%中性福尔马林、二甲苯、无水乙醇(上海试一化学试剂有限公司)、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇、ddH_2O、PBS溶液、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠单克隆抗体(包括抗原修复液、3%H_2O_2去离子水、DAB显色剂,中杉金桥PV9002),鼠抗人MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2、CD34单克隆抗体(福州迈新)、苏木精(福州迈新)、中性树脂。

1.3 Real-time RT-PCR材料

Trizol(TaKaRa RNAiso plus),氯仿(上海试一化学试剂有限公司),异丙醇(上海生工),逆转录试剂盒(TaKaRa PrimeScript® RT reagent Kit,DRR037A),荧光定量试剂盒(TaKaRa SYBR® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ,DRR820A),DEPC处理水配置的75%乙醇,无核酶水,内参引物(TaKaRa Human-GAPDH-Primer)(B702A),其余引物由TaKaRa公司合成。序列见表1。

表1 实时荧光定量RT-PCR引物序列

基因名称	GenBank登录号	序列	扩增片段长度(bp)
GAPDH	NM_002046.3	上游:5′-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3′	129
		下游:5′-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3′	
MMP-2	NM_001127891.1	上游:5′-CTCATCGCAGATGCCTGGAA-3′	104
		下游:5′-TTCAGGTAATAGGCACCCTTGAAGA-3′	
MMP-9	NM_004994.2	上游:5′-ACGCACGACGTCTTCCAGTA-3′	94
		下游:5′-CCACCTGGTTCAACTCACTCC-3′	
TIMP-1	NM_003254.2	上游:5′-CCTTATACCAGCGTTATGAGATCAA-3′	194
		下游:5′-AGTGATGTGCAAGAGTCCATCC-3′	
TIMP-2	NM_003255.4	上游:5′-GGAGCACTGTGTTTATGCTGGA-3′	96
		下游:5′-ACATGCGCAGTCTGCTTGTC-3′	

1.4 主要仪器

Eppendorf Centrifuge 5430R高速低温离心机,Applied BioSystems 2720 Thermal Cycler PCR仪,Applied BioSystems 7500荧光定量PCR仪,Thermo NANO DROP 1000分光光度计+ND1000 V3.6.0分析软件,Leica RM2245切片机,Nikon显微镜+Olympus摄像头。

1.5 方法

1.5.1 组织材料处理 将收集的治疗前活检标本或手术切除标本用PBS溶液洗净,切取1~2 mm^3小块,放入冻存管后置入液氮罐内冻存。其余标本浸入10%中性甲醛溶液内固定,并将组织块经脱水透明、浸蜡包埋等处理后,制成4 μm厚组织薄切片。

1.5.2 免疫组化方法 选择PBS代替Ⅰ抗作为阴性对照,选择已确定阳性表达的样本作阳性对照。①烘片:将组织切片放70 ℃恒温烤箱中1.5 h。②脱蜡及水化:将切片置二甲苯Ⅰ、Ⅱ中依次脱蜡15 min,再依次浸入无水乙醇Ⅰ、无水乙醇Ⅱ、95%、85%、75%梯度酒精3 min水化。PBS冲洗2 min,重复3次。③滴加3%过氧化氢去离子水溶液,加盖室温下放置14 min,以阻断内源性过氧化物酶。PBS冲洗2 min,重复3次。④浸于抗原修复液中热修复2 min,缓慢降温至室温(25 ℃左右)。PBS冲洗3 min,重复5次。⑤滴加Ⅰ抗,室温孵育2 h。PBS冲洗3 min,重复5次。⑥滴加辅助剂,室温孵育15 min。PBS冲洗3 min,重复5次。⑦滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG抗体(Ⅱ抗),室温孵育15 min。PBS冲洗3 min,重复5次。⑧滴加DAB显色5 min。双蒸水中洗涤5 min。苏木精复染2~3 min,1%盐酸酒精分化。双蒸水冲洗10~15 min。⑨75%、85%、95%梯度酒精脱水2 min,无水乙醇I脱水5 min。

⑩浸入二甲苯Ⅱ、Ⅰ各 3 min 透明,中性树脂封片,镜下观察并拍照。⑪应用 Image Pro Plus 6.0 软件,选择每张切片的空白处进行校正后,测定互不重叠的 4 个高倍镜视野(×400)下阳性反应的平均积分光密度、阳性反应面积,计算阳性面积率。以平均值作为该例的测量值。⑫计算微血管密度(MVD):200 倍光镜下挑选微血管内皮细胞染色清晰,背景对照良好的区域,在 400 倍视野下计数 10 个互不重叠的视野的血管内皮细胞 CD34 阳性的血管数目,取其平均值作为该切片的 MVD 值。剔除染色不清、难以分辨的细胞,单个棕黄色内皮细胞或细胞簇作为 1 个血管计数。管腔 >8 个红细胞直径和含管壁肌层的血管不加入计数。

1.5.3 RNA 提取及实时荧光定量 RT-PCR ①将新鲜冻存标本,置于经 DEPC 水处理预冷无菌的研钵内,液氮中充分研磨至细粉末状。加入 1 ml Trizol,待开始融化后反复研磨至透亮液态。将研磨匀浆移至 EP 管内,室温静置 5 min。于 4 ℃ 14 000 r/min 离心 5 min。②将上清液移入新 EP 管中,加入 200 μl 氯仿,剧烈振荡 1 min 后,室温静置 5 min。于 4 ℃ 14 000 r/min 离心 15 min。③重复②步骤 1 遍。④小心转移上清液至新 EP 管内,加入 500 μl 异丙醇,颠倒混匀,室温静置 10 min。于 4 ℃ 14 000 r/min 离心 10 min。⑤小心弃上清液,留沉淀,加入 1 ml 75% 乙醇(无水乙醇 + DEPC 水配置)洗涤。4 ℃ 7 500 r/min 离心 5 min,小心弃上清。7 000 r/min 短暂离心 10 s,将管壁附着液体移至管底,小心吸除,室温静置 5 ~ 10 min 晾干。⑥根据 RNA 沉淀量加入适量无核酶水溶解。⑦用分光光度计测定 RNA 纯度及浓度,样本要求 $D(260)/D(280)$ 为 1.85 ~ 2.00,浓度不低于 100 ng/μl。不符合者重新提取 RNA。⑧按照逆转录试剂盒说明,在 200 μl PCR 管内配置如下反应体系:5 × PrimeScript® Buffer (for Real-time) 4 μl, 1 × PrimeScript® RT Enzyme Mix Ⅰ 1 μl, Oligo dT Primer(50 μmol/L) 1 μl, Random 6 mers(100 μmol/L) 1 μl, Total RNA 1 μg, 并加入 RNase Free dH_2O 至反应体系为 20 μl,并离心混匀。⑨将配置好逆转录反应体系置于 PCR 仪内,按 37 ℃ 15 min→85 ℃ 5 s→4 ℃进行逆转录。所得 cDNA 样本置于 -20 ℃冰箱内冻存。⑩按荧光定量试剂盒说明,在 96 孔 PCR 反应板上配置如下反应体系:SYBR® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ (2 ×) 10 μl, PCR Forward Primer(10 μmol/L) 0.8 μl, PCR Reverse Primer(10 μmol/L) 0.8 μl, ROX Reference Dye Ⅱ (50 ×) 0.4 μl, cDNA 模板 2.0 μl, 灭菌蒸馏水 6.0 μl 构成 20 μl 反应体系,充分混匀。每个样品均设 3 个复孔。⑪置于荧光定量 PCR 仪内,按两步法标准 PCR 扩增程序进行反应:95 ℃ 30 s 预变性,95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s 并循环 40 次,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s。⑫保存并确认 Real-time PCR 的扩增曲线和融解曲线。⑬将 cDNA 样本按 10 倍梯度稀释后,按照步骤⑪ ~ ⑫进行反应,绘制标准曲线,计算扩增效率。⑭荧光定量 RT-PCR 检测数据收集:取结果接近 3 个复孔平均值作为 Ct 值,如果 3 个复孔 Ct 值偏离较大(≥2),则重新检测。另外利用绘制的标准曲线计算出各基因扩增效率。根据 Ct 值结果,计算各指标相对于内参 GAPDH 的相对表达量,计算公式如下:

$$1/\text{相对表达量} = \frac{E_{target}^{\wedge}Ct_{target}}{E_{GAPDH}^{\wedge}Ct_{target}}$$

E_{target}:待测基因扩增效率;Ct_{target}:待测基因 Ct 值;E_{GAPDH}:内参扩增效率;Ct_{GAPDH}:内参 Ct 值。

1.6 统计学分析

将平均积分光密度、MVD 以 $\bar{x} \pm s$ 表示,平均阳性面积率以中位数/4 分位间距表示。使用 SPSS 19.0 统计软件,用配对 t 检验(平均阳性面积率采用配对样本比较的 Wilcoxon 符号秩和检验)对口服普萘洛尔治疗前后血管瘤组织内同一蛋白表达水平以及 MVD 值差异进行比较分析。各指标相对表达量以中位数/四分位间距表示,最后采用 REST 2009 软件进行统计分析。相关性分析:计算口服用药前后 MVD 值的比值(近似作为疗效判断指标),以及 4 个因子平均积分光密度(近似作为蛋白表达量)、mRNA 相对表达量比值,进行 Spearman 相关性分析。

2 结果

2.1 临床病例观察

39 例病例经口服普萘洛尔治疗后,血管瘤病灶均出现消退迹象,表现为瘤体减小,表面颜色变暗、张力减低。典型病例:患儿,男性,3 个月,右肩部血管瘤伴破溃出血清创缝合后,口服用药前病灶与口服用药 8 周后病灶对比见图 1。



A:用药前;B:用药 8 周后

图 1 血管瘤患儿口服普萘洛尔治疗前后的对比观察

2.2 免疫组化结果

2.2.1 CD34 染色结果与 MVD 计数情况 CD34 主要表达于血管内皮细胞细胞质中(图 2)。口服普萘洛尔前可见病灶内有新生血管致密,部分内皮细胞呈团块状增生,内皮细胞胞浆内有大量浓密棕黄色颗粒;计算 MVD 值为(96.297 0 ± 18.392 3)。口服普萘洛尔后病灶内新生血管密度明显减低,血管腔增大,周围结缔组织增多,内皮细胞细胞质内棕黄色浓度较前减低;计算 MVD 值为(42.282 1 ± 12.783 5)。口服普萘洛尔治疗前后 MVD 值采用配对 t 检验,二者差异存在统计学意义($t = 18.458$, $P < 0.01$)。

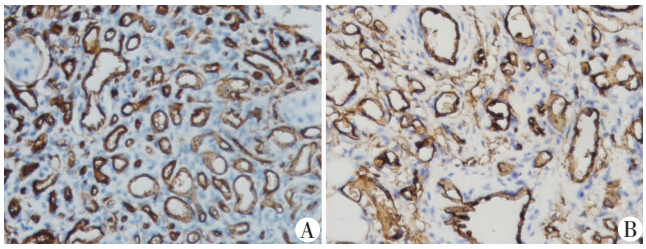


图 2 血管瘤患儿口服普萘洛尔治疗前(A)、后(B)病灶内 CD34 的表达 (Polymer HRP ×400)

表2 免疫组化检测血管瘤患儿口服普萘洛尔治疗前后4个指标的表达($n=39$)

指标	平均积分光密度($\bar{x}\pm s$)				平均阳性面积率(中位数/四分位间距)			
	治疗前	治疗后	t值	P值	治疗前	治疗后	Z值	P值
MMP-2	17.129 050±1.615 731	8.137 341±0.826 982	32.983	<0.01	0.147 992/0.019 800	0.061 128/0.001 100	−5.442	<0.01
MMP-9	16.362 460±1.868 310	7.745 733±1.392 203	27.181	<0.01	0.136 506/0.019 900	0.054 132/0.003 000	−5.442	<0.01
TIMP-1	3.111 116±0.288 015	9.454 852±1.001 283	−39.107	<0.01	0.012 522/0.001 900	0.120 001/0.020 900	−5.442	<0.01
TIMP-2	2.897 687±0.344 396	10.176 700±0.975 641	−41.590	<0.01	0.011 749/0.002 400	0.128 803/0.040 600	−5.442	<0.01

2.2.2 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2染色结果 4种蛋白均主要定位于血管内皮细胞胞浆内(图3~6)。口服普萘洛尔前病灶内内皮细胞胞浆中有较多MMP-2、MMP-9表达(大量棕黄色颗粒沉着),而TIMP-1、TIMP-2表达水平较低(棕黄色颗粒稀疏)。而口服普萘洛尔后细胞质内MMP-2、MMP-9表达水平下降(棕黄色浓度减低),而TIMP-1、TIMP-2表达水平上升(棕黄色颗粒较前浓密)。上述4个因子治疗前后表达水平差异均具有统计学意义($P<0.01$,表2)。

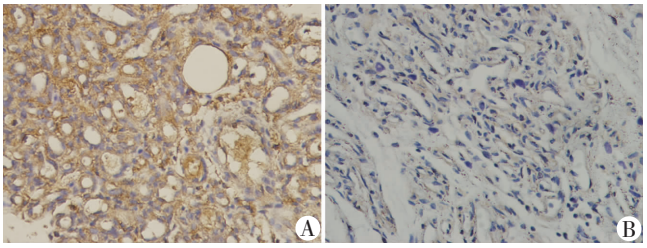


图3 血管瘤患儿口服普萘洛尔治疗前(A)、后(B)病灶内MMP-2的表达 (Polymer HRP ×400)

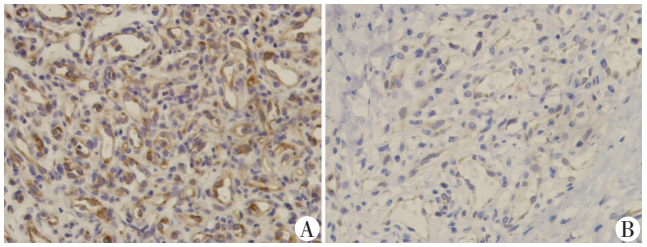


图4 血管瘤患儿口服普萘洛尔治疗前(A)、后(B)病灶内MMP-9的表达 (Polymer HRP ×400)

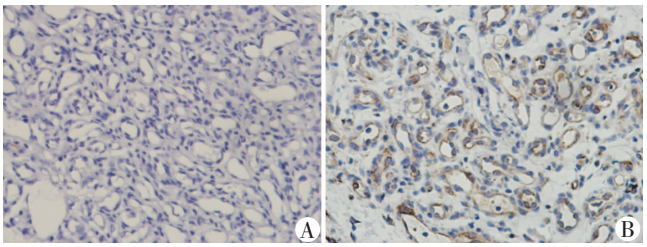


图5 血管瘤患儿口服普萘洛尔治疗前(A)、后(B)病灶内TIMP-1的表达 (Polymer HRP ×400)

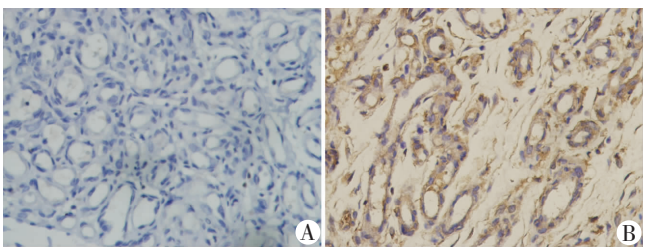


图6 血管瘤患儿口服普萘洛尔治疗前(A)、后(B)病灶内TIMP-2的表达 (Polymer HRP ×400)

2.3 Real-time RT-PCR结果

各样本各指标扩增曲线均已到达平台期,3个复孔重复性良好。融解曲线形成高窄单峰,未检测到引物二聚体形成。经REST 2009软件分析,用药后MMP-2、MMP-9 mRNA转录水平较用药前下降,TIMP-1、TIMP-2 mRNA转录水平较用药前上升,差异均有统计学意义($P<0.01$,表3)。

表3 实时荧光定量RT-PCR检测血管瘤患儿口服普萘洛尔治疗前后4个指标的表达($n=39$)

指标	扩增效率	相对表达量(中位数/4分位间距)		P值
		治疗前	治疗后	
MMP-2	2.018 725	0.792 545/0.713 352	0.040 550/0.003 672	<0.01
MMP-9	2.009 356	0.201 944/0.278 774	0.016 520/0.023 250	<0.01
TIMP-1	1.997 533	0.000 091/0.000 168	0.088 007/0.030 150	<0.01
TIMP-2	2.001 163	0.000 473/0.001 405	0.286 843/0.180 617	<0.01

内参GAPDH的扩增效率为:1.993 721

2.4 治疗前后MVD比值与MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 mRNA及蛋白表达的相关性分析

口服用药前后MVD比值与MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2平均积分光密度比值相关系数分别为0.895、0.974、−0.869、−0.890($P<0.01$)。口服用药前后MVD比值与MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 mRNA相对表达量比值相关系数分别为0.982、0.958、−0.996,−0.998($P<0.01$)。

3 讨论

目前对血管瘤的确切发病机制仍尚未完全清楚。Folkman等[18]提出,血管瘤的发生是由于血管发生及修复的紊乱失调所引起,血管发生是血管瘤形成的重要的因素,其主要的特征是毛细血管的内皮细胞增生。而Boye等[19]研究发现,血管瘤内皮细胞增殖是由于体细胞基因突变,导致控制内皮细胞生长的几种调节因子基因表达失调,使内皮细胞克隆性增生。但是内皮细胞大量增殖并不能独立完成新生血管的形成。新生血管形成还需要基底膜局部降解,内皮细胞在细胞外间质迁移,并进一步分化而成。

基质金属蛋白酶(MMPs)是一类具有锌离子及钙离子依赖性的细胞外蛋白水解酶。它不仅可促进血管生成因子VEGF、bFGF等的释放,促进血管生成,还可降解细胞外基质,促进内皮细胞迁移及管状结构的形成。MMPs在胚胎发育及在生理或病理状态下都具有重要作用,如细胞增殖、血管重塑、恶性肿瘤的侵袭及转移等。目前已知的MMPs有20余种,其中MMP-2、MMP-9属于Ⅳ型胶原酶,而Ⅳ型胶原酶是人体基底膜

及细胞外基质的组成成分,在血管形成中起着重要作用。而 TIMP-2、TIMP-1 分别是二者的拮抗剂。目前已有研究者发现,增殖期、消退期血管瘤病灶内 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 表达水平存在差异。其中增殖期 MMP-2、MMP-9 表达水平高于消退期,而 TIMP-1、TIMP-2 表达水平低于消退期[20-21]。

普萘洛尔(商品名:心得安)是第 1 个应用于临床的非选择性 β 受体阻滞剂,被认为是 20 世纪最重要的临床药学发明之一。其左旋异构体可可逆性地与 β1 和 β2 肾上腺素能受体结合,稳定细胞膜结构,并产生降低心率、降低心输出量、收缩外周血管,降低外周血管血流量的作用。目前临床上主要用于各种快速性心律失常、心绞痛、高血压、嗜铬细胞瘤等的治疗。目前已有研究发现,普萘洛尔干预可使体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)发生 G_0/G_1 期停滞,与细胞周期相关蛋白 Cyclin D1、Cyclin D3 和 CDK6 表达水平下调,而 CDK 拮抗剂 p15INK4B, p21WAF1/Cip1 and p27Kip1 表达上调,下调 VEGF 的表达以及 VEGF 介导的下游产物磷酸化过程。同时可抑制 HUVECs 在基质胶中定向移动和分化为毛细血管状管状结构,从而抑制新生血管形成[22]。

本研究通过免疫组化及实时荧光定量 RT-PCR 比较口服普萘洛尔前后婴幼儿血管瘤病灶内 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 及 TIMP-2 表达水平的变化,发现婴幼儿血管瘤病灶内上述 4 个因子表达水平在口服用药前后存在显著性差异($P<0.01$)。口服用药后 MMP-2、MMP-9 表达水平下调,而 TIMP-1、TIMP-2 表达水平上调。同时通过相关性分析提示,口服用药前后上述 4 个因子变化水平与病灶改善程度(用 MVD 值变化程度表示)密切相关。提示普萘洛尔不仅可收缩血管、降低病灶局部灌注,还可同时通过下调 MMP-2、MMP-9 的表达,上调 TIMP-1、TIMP-2 的表达等途径抑制血管瘤血管内皮细胞增殖以及新生血管的形成,从而达到治疗血管瘤的目的。

参考文献:

[1] Drolet B A, Swanson E A, Frieden I J. Infantile hemangiomas: an emerging health issue linked to an increased rate of low birth weight infants[J]. J Pediatr, 2008, 153(5): 712-715.

[2] Eivazi B, Ardelean M, Baumler W, *et al*. Update on hemangiomas and vascular malformations of the head and neck[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2009, 266(2): 187-197.

[3] Bruckner A L, Frieden I J. Hemangiomas of infancy[J]. J Am Acad Dermatol, 2003, 48(4): 477-493.

[4] Leaute-Labreze C, Dumas-de-la-Roque E, Hubiche T, *et al*. Propranolol for severe hemangiomas of infancy[J]. N Engl J Med, 2008, 358(24): 2649-2651.

[5] Siegfried E C, Keenan W J, Al-Jureidini S, *et al*. More on propranolol for hemangiomas of infancy[J]. N Engl J Med, 2008, 359(26): 2846-2847.

[6] Hogeling M, Adams S, Wargon O. A randomized controlled trial of propranolol for infantile hemangiomas[J]. Pediatrics, 2011, 128(2): e259-e266.

[7] Mazereeuw-Hautier J, Hoeger P H, Benlahrech S, *et al*. Efficacy of propranolol in hepatic infantile hemangiomas with diffuse neonatal hemangiomatosis[J]. J Pediatr, 2010, 157(2): 340-342.

[8] Holmes W J, Mishra A, Gorst C, *et al*. Propranolol as first-line treatment for infantile hemangiomas[J]. Plast Reconstr Surg, 2010, 125(1): 420-421.

[9] Arneja J S, Pappas P N, Shwayder T A, *et al*. Management of complicated facial hemangiomas with beta-blocker (propranolol) therapy[J]. Plast Reconstr Surg, 2010, 126(3): 889-895.

[10] Mousa W, Kues K, Haas E, *et al*. Successful treatment of a large hemangioma with propranolol[J]. J Dtsch Dermatol Ges, 2010, 8(3): 184-186.

[11] Mabeta P, Pepper M S. Hemangiomas-current therapeutic strategies[J]. Int J Dev Biol, 2011, 55(4/5): 431-437.

[12] Solomon T, Ninnis J, Deming D, *et al*. Use of propranolol for treatment of hemangiomas in PHACE syndrome[J]. J Perinatol, 2011, 31(11): 739-741.

[13] Buckmiller L, Dyamenahalli U, Richter G T. Propranolol for airway hemangiomas: case report of novel treatment[J]. Laryngoscope, 2009, 119(10): 2051-2054.

[14] Zaher H, Rasheed H, Hegazy R A, *et al*. Oral propranolol: an effective, safe treatment for infantile hemangiomas[J]. Eur J Dermatol, 2011, 21(4): 558-563.

[15] Lawley L P, Siegfried E, Todd J L. Propranolol treatment for hemangioma of infancy: risks and recommendations[J]. Pediatr Dermatol, 2009, 26(5): 610-614.

[16] Sans V, de-la-Roque E D, Berge J, *et al*. Propranolol for severe infantile hemangiomas: follow-up report[J]. Pediatrics, 2009, 124(3): e423-e431.

[17] 詹明坤, 谢义德, 郭志辉, 等. 大剂量普萘洛尔治疗严重婴幼儿血管瘤的初步临床观察[J]. 中华整形外科杂志, 2011, 27(3): 166-169.

[18] Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis[J]. N Engl J Med, 1995, 33(1): 1757-1763.

[19] Boye E, Yu Y, Paranya G, *et al*. Clonality and altered behavior of endothelial cells from hemangiomas[J]. J Clin Invest, 2001, 107(6): 745-752.

[20] Sun Z Y, Yang L, Yi C G, *et al*. Possibilities and potential roles of estrogen in the pathogenesis of proliferation hemangiomas formation[J]. Med Hypotheses, 2008, 71(2): 286-292.

[21] 王彪, 庄福连, 吴秀凤, 等. MMP-2、TIMP-2、VEGF 和 bFGF 在血管瘤增生及消退过程中的变化[J]. 中华医学美学美容杂志, 2007, 13(5): 280-283.

[22] Lamy S, Lachambre M P, Lord-Dufour S, *et al*. Propranolol suppresses angiogenesis *in vitro*: inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells[J]. Vascul Pharmacol, 2010, 53(5/6): 200-208.

(**收稿**:2012-08-06;**修回**:2012-09-13)

(编辑 王 红)