维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)02-0198-04

糖皮质激素治疗血管瘤机理的初步探讨

刘 潜[1],金先庆[1],周德凯[1],王 珊[1],李晓庆[1],李 静[2],唐开勇[3]

(1.重庆医科大学儿童医院普外科,重庆 400014;2.重庆医科大学基础医学院组胚教研室,重庆 400016;
3.重庆医科大学儿童医院病理科,重庆 400014)

【摘 要】目的:初步探讨糖皮质激素治疗血管瘤的机理。方法:采用光镜和电镜技术对 22 例血管瘤石蜡标本及 5 例正常皮肤标本进行形态学观察;并用 TUNEL 法检测血管内皮细胞(vascular endothelia cell,VEC)凋亡及免疫组化方法检测增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)。结果:所有病例标本中均未发现明显炎症及坏死征象;透射电镜观察发现显效组 VEC 呈典型的凋亡形态变化,未见坏死征象;治疗显效组血管瘤 VEC 的凋亡水平显著高于无效组、未治疗组及正常皮肤组,而 PCNA 水平低于上述 3 组;未治疗组和无效组之间凋亡水平无显著性差异。结论:糖皮质激素可能通过诱导 VEC 凋亡及抑制其增殖而促进血管瘤消退。

【关键词】糖皮质激素;血管瘤;血管内皮细胞;增殖;凋亡
【中国图书分类法分类号】R730.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-07-17

Primary study on the mechanism of intralesional therapy for hemangioma with glucocorticoid

LIU Qian, et al

(*Department of General Surgery, Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the mechanism of intralesional therapy for hemangioma with glucocorticoid. *Methods*: Apoptosis versus proliferation of vascular endothelial cells (VEC) in 22 specimens from 3 groups of infantile hemangioma (group 1: 6 involuting cases after intralesional therapy; group 2: 6 proliferative cases after intralesional therapy; group 3: 10 proliferative cases, never been treated), and 5 normal skin tissues were analyzed, using the TUNEL assay to detect apoptotic cells and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) to detect dividing cells. In morphologic observation, light microscope was used for all of the specimens and transmissional electron microscope was used for one involuting case after treatment. *Results*: No sign of inflammation or necrosis was found in morphologic obsevertion in all of the cases. Apoptosis was high in 6 hemangiomas in involuting phase after treatment, and was much lower in other groups of hemangiomas and normal skin tissue. While the proliferation of VEC showed a totally reverse tendency, compared with apoptosis. *Conclusion*: Glucocorticoid may promote the involution of hemangioma by inducing the apoptosis and down regulating the proliferation of VEC.

【Key words】Glucocorticoid; Hemangioma; Vascular endothelial cell; Proliferation; Apoptosis

血管瘤是小儿最常见的肿瘤,绝大多数为良性。糖皮质激素治疗因能有效抑制血管瘤生长,促进其消退且无治疗所致的美容损害而被公认为首选方法。其治疗机理目前尚不十分清楚。本文通过对 22 例毛细血管瘤标本及 5 例正常皮肤标本进行凋亡和增殖水平检测以及组织形态学观察,初步探讨糖皮质激素治疗血管瘤的机理。

作者介绍:刘 潜(1971-),男,硕士,主治医师,
主要研究方向:血管瘤基础及临床研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

取手术切除的毛细血管瘤标本 22 例及正常皮肤标本 5 例(患儿年龄均在 4 月~2 岁),分组如下:未治疗组 10 例,术前未接受任何治疗且处于快速增生期;治疗显效组 6 例,术前糖皮质激素注射治疗 2~4 次,瘤体萎缩超过 1/2;治疗无效组 6 例,术前糖皮质激素注射治疗 2~4 次,但瘤体仍继续增长;正常对照组 5 例,择期手术中所取正常婴幼儿皮肤。

1.2 主要试剂

原位细胞凋亡检测试剂盒(宝灵曼公司);鼠抗人 PCNA

维普资讯 http://www.cqvip.com

单克隆抗体(福州迈新生物技术开发公司);SP 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 光镜下组织形态学观察 标本进行常规 H.E 染色后,光学显微镜下观察其组织学特点、血管内皮细胞(VEC)增殖情况及血管壁结构完整性。

1.3.2 透射电子显微镜观察 常规无菌术切除显效组血管瘤瘤体 1 例,修去脂肪组织后切成小块,用 2.5% 戊二醛固定,按常规方法制备半薄切片、超薄切片,H600 型透射电子显微镜观察、摄片。

1.3.3 凋亡细胞的原位检测 采用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的带荧光的 dUTP 缺口末端标记法(TdT - mediated dUTP nick end labeling, TUENL),原位标记凋亡细胞核中的 DNA 片段 3' - OH 末端,显示未治疗组、治疗显效组和治疗无效组及正常对照组 VEC 的凋亡。检测方法按宝灵曼公司试剂盒说明书进行。光镜 400 倍下不同视野随机观察 300 个 VEC,胞核染色为棕色者计为阳性细胞,记数凋亡指数。

1.3.4 免疫组织化学染色(SP 法)检测 VEC 的增殖细胞核抗原(PCNA)水平 采用 SP 免疫组织化学法检测未治疗组、治疗显效组和治疗无效组及正常对照组 VEC 内的 PCNA 表达。光镜 400 倍下不同视野随机观察 300 个 VEC,胞核染色为棕色者计为阳性细胞,记数阳性率。

1.4 统计学处理

所获实验数据均输入计算机,经 SAS 统计软件进行方差分析和 q 检验,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,$P<0.01$ 为显著性意义。

2 结 果

2.1 光镜下组织形态学观察

与正常皮肤组相比,显效组 6 例血管瘤在镜下以脂肪组织及少量纤维组织为主,VEC 无明显增殖现象,未见明显淋巴细胞浸润、血管壁塌陷、管腔堵塞及 VEC 脱落等组织结构破坏征象;未治疗组 10 例以及无效组 6 例在镜下以大量增生的毛细血管为主,VEC 增殖活跃,未见前述组织结构破坏征象(见图 1~3)。

2.2 透射电子显微镜观察

许多 VEC 呈典型的凋亡形态变化:染色质固缩聚于核膜下,境界分明,有完整的核膜包绕,细胞浆浓缩,可见线粒体轻度肿胀等,未见明显 VEC 坏死征象(见图 4)。

2.3 糖皮质激素对血管瘤 VEC 增殖及凋亡的影响

治疗显效组与无效组及正常皮肤组之间 VEC 凋亡有明显差别,未治疗组与治疗显效组、正常皮肤组间 VEC 凋亡有显著性差别;各组间 VEC 增殖有显著性差别(表 1,图 5~8)。



图 1 增生期血管瘤组织(HE×100)

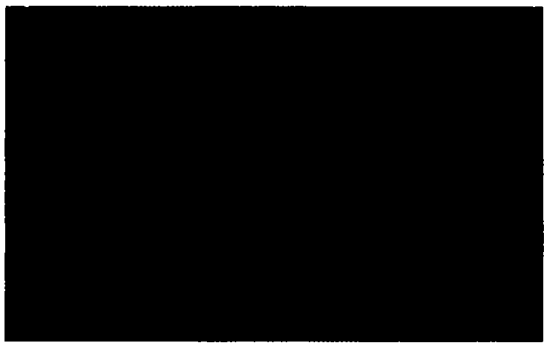


图 2 治疗显效组血管瘤组织(HE×400)



图 3 治疗无效组血管瘤组织(HE×400)

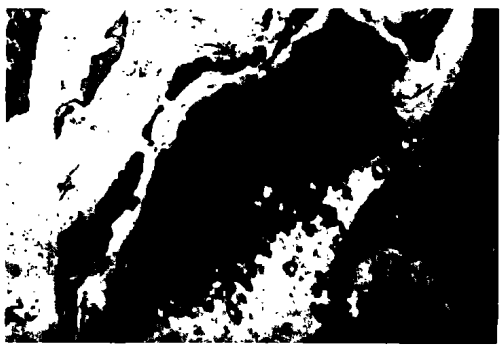


图 4 治疗显效组血管瘤中凋亡的 VEC×6000

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 5 治疗显效组血管瘤 VEC 的凋亡情况(TUNEL×400)

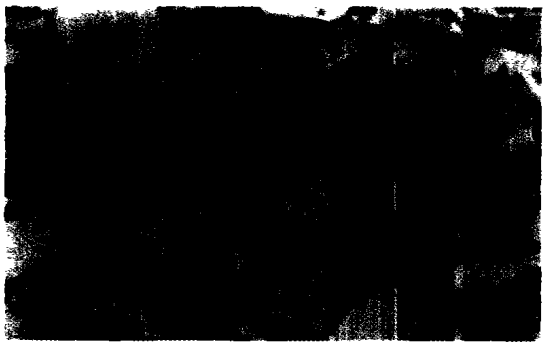


图 6 治疗无效组血管瘤 VEC 的凋亡情况(TUNEL×400)



图 7 治疗显效组血管瘤 VEC 中 PCNA 的表达(IHC×400)



图 8 治疗无效组血管瘤 VEC 中 PCNA 的表达(IHC×400)

表 1 各组 VEC 凋亡指数及 PCNA 阳性表达指数($\bar{x} \pm s\%$)

组 别	TUNEL	PCNA
未治疗组	19.10±2.77	59.70±4.81
治疗显效组	49.17±3.16*	9.83±4.02*
治疗无效组	23.00±3.90	44.83±4.17
正常皮肤组	37.40±3.85	15.80±3.49

注:*与未治疗组、治疗无效组及正常皮肤组相比 $P<0.01$

3 讨 论

血管瘤是小儿最常见的肿瘤,多数因能自然、缓慢地消退而不需特殊治疗。但某些生长在颜面等特殊部位及增长特别迅速者可影响正常器官功能或引起溃疡、出血和疼痛等并发症,故需积极治疗。临床上使用糖皮质激素治疗血管瘤已有多年,主要通过口服或瘤体内注射两种途径。国内王赞尧等[1]使用糖皮质激素治疗血管瘤无红、肿等炎症表现,后期瘤体消退后无疤痕残留和色素沉着,这与血管瘤自然消退过程相似。目前认为,血管瘤的自然增殖及消退可能与 VEC 增殖——凋亡平衡关系的变化有关[2,3]。此外,有研究显示糖皮质激素可诱导胸腺细胞、B 淋巴细胞及大鼠肝细胞等发生凋亡[4],提示糖皮质激素可能通过影响 VEC 的增殖与凋亡而促使血管瘤"自然"消退。

凋亡与坏死为细胞死亡的两种方式,其区别在于:前者为程序性死亡,并无溶酶体破裂,故无炎症现象;而后者通过溶酶体破裂,释放出各种溶解酶,使细胞裂解、死亡,伴有炎症表现[5]。为证实 VEC 发生了凋亡而非坏死,本研究通过光镜下组织形态学观察发现:与正常皮肤相比,治疗显效组 VEC 增殖水平低,无明显淋巴细胞浸润、血管壁塌陷、管腔堵塞、VEC 脱落等炎症及坏死征象,提示治疗显效组 VEC 发生了调亡;未治疗组及无效组 VEC 增殖活跃,亦未见组织结构破坏等炎症及坏死征象。在透射电镜下观察,治疗显效组可见许多 VEC 呈典型的凋亡形态变化:染色质固缩聚于核膜下,境界分明,有完整的核膜包绕,细胞浆浓缩,可见线粒体轻度肿胀等,未见明显 VEC 坏死征象。提示糖皮质激素能促进 VEC 凋亡而抑制其增殖。

为进一步证实这一推测,我们在实验中检测了各组 VEC 的 TUNEL 阳性率及 PCNA 表达水平,从而了解其增殖—凋亡平衡的变化。TUNEL 是检

维普资讯 http://www.cqvip.com

测细胞凋亡的一种敏感性和特异性均较高的方法[6],增殖细胞核抗原(PCNA)则是反映细胞增殖情况的良好指标[7]。实验数据显示,处于增生期的未治疗组血管瘤 VEC 的 PCNA 表达明显高于其他各组,而 TUNEL 阳性率显著低于显效组及正常皮肤组,提示该组血管瘤 VEC 增殖活跃而凋亡水平低下。治疗显效组血管瘤 VEC 的 TUNEL 阳性率显著高于无效组、未治疗组及正常皮肤组,而 PCNA 表达水平低于上述 3 组,显示糖皮质激素注射治疗后,显效组血管瘤 VEC 凋亡水平上升而增殖水平降低,提示糖皮质激素可能诱导显效组血管瘤 VEC 凋亡而抑制其增殖,使 VEC 堆积逐渐减少,从而促使血管瘤消退,至于其诱导 VEC 凋亡的机理,尚有待进一步研究。此外,治疗无效组 TUNEL 阳性率显著低于治疗显效组,而和未治疗组之间无显著性差异;在 VEC 增殖方面,治疗无效组 PCNA 水平显著高于治疗显效组;在 HE 染色中 6 例均以大量增生的毛细血管为主,VEC 增殖活跃。提示对治疗无效组而言,糖皮质激素未能促进其 VEC 凋亡及抑制其增殖,这可能正是该部分血管瘤治疗无效的原因之一。

综上,糖皮质激素可能通过诱导 VEC 凋亡及抑制其增殖而促进血管瘤消退,其具体机制尚待深入研究。

参 考 文 献

[1] 王赞尧,周德凯,王 勇. 糖皮质激素瘤内注射治疗婴幼儿血管瘤[J]. 中华小儿外科杂志,1993;14(3):133 - 135.

[2] Razon MJ, Kraling BM, Mulliken JB, et al. Increased apoptosis coincides with onset of involution in infantile hemangioma[J]. Microcirculation, 1998;5(2 - 3):189 - 202.

[3] Macini AJ, Smoller BR. Proliferation and apoptosis within juvenile capillary hemangioma[J]. Am J Dermatopathol, 1996;18:505 - 507.

[4] 沈 青,陈星琪. 糖皮质激素调节体细胞凋亡研究进展[J]. 国外医学儿科学分册,1997;24(2):67 - 69.

[5] 程尉新,金丽娟. 细胞凋亡与坏死的鉴别及研究方法进展[J]. 细胞生物学杂志,1998;20(2):58 - 63.

[6] 仉红刚. 细胞凋亡 DNA 检测技术概况[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,1997;18(1):12 - 14.

[7] 林晓曦,王 炜,钱文牛等. 增殖细胞核抗原在血管瘤及血管畸形组织中的表达[J]. 中华整形烧伤外科杂志,1998;14(1):19 - 20.

(上接第 150 页)

[5] Pinhas - Hamiel O, Standiford D, Hamiel D, et al. The type 2 family: a setting for development and treatment of adolescent type 2 diabetes mellitus [J]. Arch Pediatr Adolesc Med, 1999;153(10):1063 - 1067.

[6] Niwa H, Harrison LC, DeAizpurua HJ, et al. Identification of pancreatic beta cell - related genes by representational difference analysis [J]. Endocrinology, 1997;138(4):1419 - 1426.

[7] 何新桥,金玫蕾. 实验动物饲养与管理[M]. 科学出版社,1998;66 - 71.

[8] Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, et al. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response [J]. J Clin Invest, 1969;48(11):2129 - 2139.

[9] Holmang A, Bjorntorp P. The effects of testosterone on insulin sensitivity in male rats [J]. Acta Physiol Scand, 1992;146(4):505 - 510.

[10] Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution [J]. Diabetes Care, 1991;14(12):1132 - 1143.

[11] Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, et al. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high - fat - fed rats [J]. Diabetes, 1991;40(11):1397 - 1403.

[12] Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat - fed, streptozotocin - treated rat [J]. Metabolism, 2000;49(11):1390 - 1394.