

- [6] Spencer KM. Craniosacral therapy in the midwifery model of care [J]. Midwifery Today Int Midwife, 2008(87):14-15,65.
- [7] Elden H, Östgaard HC, Glantz A, et al. Effects of craniosacral therapy as adjunct to standard treatment for pelvic girdle pain in pregnant women: a multicenter, single blind, randomized controlled trial [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2013, 92(7):775-782.
- [8] Matarín-Peñarocha GA, Castro-Sánchez AM, García GC, et al. Influence of craniosacral therapy on anxiety, depression and quality of life in patients with fibromyalgia [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011; 2011:178769.
- [9] Białoszewski D, Bebelski M, Lewandowska M, et al. Utility of craniosacral therapy in treatment of patients with non-specific low back pain. Preliminary report [J]. Ortop Traumatol Rehabil, 2014, 16(6):605-615.
- [10] Whedon JM, Glassey D. Cerebrospinal fluid stasis and its clinical significance [J]. Altern Ther Health Med, 2009, 15(3):54-60.
- [11] 狄荣科, 曾建. 颅骶技术对脏腑经络功能调节作用的检测 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(11):1236-1238.

收稿日期: 2015-04-30 修回日期: 2015-06-01 编辑: 王国品

· 临床研究 ·

β 肾上腺素受体及血管内皮细胞生长因子在婴幼儿血管瘤组织中的表达

蔡湘娜¹, 林晓斌², 李吉林³, 纪影畅¹, 许宏权¹, 李宏生¹

1. 汕头大学医学院第一附属医院整形美容科, 广东 汕头 515041;

2. 汕头大学医学院第一附属医院小儿外科, 广东 汕头 515041;

3. 汕头大学医学院第一附属医院心血管内科, 广东 汕头 515041

摘要: **目的** 探讨 β 肾上腺素受体 2 (β₂-AR) 及血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 在血管瘤病理发展过程中的意义。**方法** 收集增生期 (<12 个月) 血管瘤标本 8 例及消退期 (13~60 个月) 的血管瘤标本 7 例, 通过免疫组织化学的方法检测不同时期血管瘤组织中 β₂-AR 及 VEGF 的表达情况, 并通过图像分析技术测量平均吸光度值。对定量结果进行单因素方差分析。**结果** β₂-AR 在增生期呈强阳性表达, 消退期呈阴性或弱阳性表达。VEGF 在增生期呈强阳性表达, 消退期呈弱阳性表达。β₂-AR 和 VEGF 表达的吸光度值在血管瘤增生期明显高于消退期, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。**结论** β₂-AR 及 VEGF 可能参与了血管瘤的发生、发展及消退等病理过程。

关键词: 血管瘤, 婴幼儿; 增生期; 消退期; β 肾上腺素受体; 血管内皮细胞生长因子

中图分类号: R 726.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2015)11-1506-03

婴幼儿血管瘤 (infantile hemangioma) 又称真性血管瘤, 是儿童期常见的良性肿瘤, 发病率高达 10%~12%^[1]。血管瘤有其独特的自然病史, 多数患儿出生后 8~12 个月持续增生, 随后自发地缓慢消退。至 5 岁时, 50% 以上的血管瘤完全消退, 9 岁时, 90% 完全消退, 最长消退可持续至 12 岁^[2]。近年来, 口服普萘洛尔治疗婴幼儿血管瘤开始应用于临床且疗效显著^[4], 但具体的机制目前仍不明确。普萘洛尔是一种 β 肾上腺素受体阻滞剂, 其机制可能通过与 β 肾上腺素受体结合, 影响血管瘤生长因子的表达, 从而抑制血管瘤的增生。本实验拟通过检测不同时期血管瘤组织中 β 肾上腺素受体 2 (β₂-AR) 及血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的表达情况, 分析其在血管

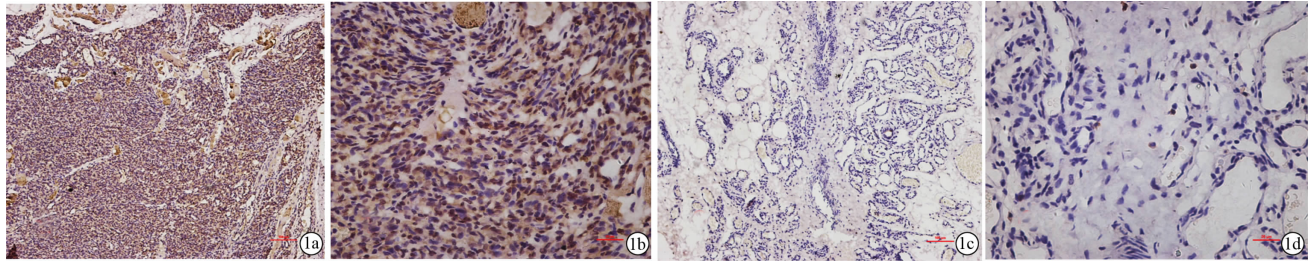
瘤的病理发展过程中的作用, 从而为血管瘤的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

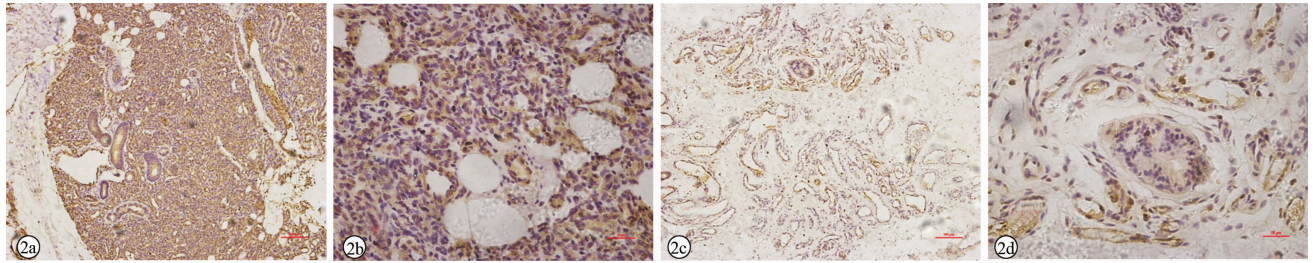
1.1.1 标本来源 选取我院手术切除的血管瘤标本 15 例, 术前均未经任何治疗。其中男 5 例, 女 10 例; 年龄 3 个月~5 岁。根据病史、临床表现和影像学资料, 按照 Mulliken 分类法将血管瘤分为 3 期: 增生期 (<12 个月) 8 例, 消退期 (13~60 个月) 7 例, 退化期因未能采集到标本, 不纳入本组研究。新鲜标本用 10% 甲醛固定, 石蜡包埋。

1.1.2 实验试剂与仪器 抗 β₂-AR 兔抗人多克隆抗体 (英国 Abcam 公司), 鼠抗人 VEGF 单克隆抗体 (中杉金桥), 二抗为基因科技 (上海) GTVision TM III 抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒。图像采集显微



注:1a:增生期(×100);1b:增生期(×400);1c:消退期(×100);1d:消退期(×400)。

图1 β2-AR 在血管瘤增生期和消退期表达情况



注:2a:增生期(×100);2b:增生期(×400);2c:消退期(×100);2d:消退期(×400)。

图2 VEGF 在血管瘤增生期和消退期表达情况

表1 各期血管瘤组织中β2-AR及VEGF的吸光度值比较(̄x±s)

血管瘤分期	例数	β2-AR	VEGF
增生期	8	0.121332784 ± 0.029417539 *	0.127712780 ± 0.011061549 *
消退期	7	0.042258202 ± 0.013563429	0.053992557 ± 0.011750908

注:与消退期比较,*P<0.01。

镜为尼康 ECLIPSE Ni-E。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学(免疫组化)染色 石蜡标本进行4 μm连续切片,每例随机选取切片2张,采用免疫组化二步法染色,主要步骤为:(1)切片常规脱蜡、水化;(2)0.01 mol/L 枸橼酸钠修复液抗原热修复,自然冷却至室温;(3)3% H₂O₂ 孵育阻断内源性过氧化物酶;(4)加入一抗(浓度为抗β2-AR 1:100)4℃过夜;(5)加入二抗、DAB显色、苏木素复染、脱水、中性树脂封片。各步骤均以PBS浸洗。免疫组化染色每组均以PBS代替一抗作阴性对照。

1.2.2 染色结果的判定 阳性细胞为结构清晰、细胞膜或细胞质中出现明显高于背景色的黄色或棕黄色颗粒。在显微镜下放大400倍分析,每张切片随机选取5个视野,拍摄图像后用Image Pro Plus 6.0软件对其进行分析。选择参数阳性面积、积分吸光度,测定阳性物质表达的平均吸光度值。

1.3 统计学分析 采用SPSS 19.0软件处理数据。指标测定结果以̄x±s表示,组间比较进行单因素方差分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

β2-AR在血管瘤各期的血管内皮细胞均有表达,在增生期呈强阳性表达(图1a、图1b),消退期呈弱阳性或阴性表达(图1c、图1d),各期之间差异有统计学意义(P<0.01)。VEGF在血管瘤各期的血管内皮细胞均有表达,在增生期呈强阳性表达(图2a、图2b),消退期呈弱阳性表达(图2c、图2d)。β2-AR和VEGF表达的吸光度值在血管瘤增生期明显高于消退期,差异均有统计学意义(P均<0.01)。见表1。

3 讨论

婴幼儿血管瘤具有明显的生命周期,不管从临床上或组织学上均可分为3个期:增生期、消退期和退化期。不同时期血管瘤的组织学形态和细胞构成及表型具有明显的区别。增生期血管瘤由大量的细胞及未成熟的血管组成,消退期血管瘤可见由内皮层和血管外膜层组成的完整血管,而退化期血管瘤包含有脂肪细胞、纤维沉积和少量残存的血管^[5]。

普萘洛尔是一种非选择性的β肾上腺素能受体阻滞剂,它对β1和β2受体具有同样的阻滞作用。最近有研究发现普萘洛尔抑制了生长因子诱导的内皮细胞的增殖、迁移及形成管形,并进一步发现普萘洛尔抑制了VEGF诱导的细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase-1/2, ERK-1/2)的酪氨酸磷酸化及亲基质金属蛋白酶(proMMP-2)的分泌。这表明,普萘洛尔抑制血管生成的效应可能不仅

通过 β -ARs 信号,还通过抑制 VEGFR-2 旁路,但其机制还需要进一步的研究。普萘洛尔可能干扰了血管形成的几个重要步骤^[6]。根据普萘洛尔的药物作用机制,它可能通过以下 3 种不同的分子机制抑制血管瘤的增生:血管收缩、抑制血管增生及诱导内皮细胞凋亡。

新生血管的形成是血管瘤进展的基本要素,受多种因素共同的调控,其中,VEGF 扮演着至关重要的角色^[5]。VEGF 在血管瘤的增生期高表达,而消退期和退化期低表达甚至不表达^[7]。赵忠芳等^[8]的研究也表明普萘洛尔可降低血管瘤增生期患儿血清中 VEGF 的水平,而血管瘤的增生与 VEGF 水平上调有关^[9]。血管瘤内皮细胞为血管瘤的重要组成部分,血管瘤的消退也伴随着明显的细胞凋亡。普萘洛尔和 β 2-AR 特异性抑制剂均能促进血管内皮细胞的凋亡,且作用明显强于 β 1-AR 特异性抑制剂^[10]。

本研究结果表明, β 2-AR 在增生期血管瘤组织中高表达,在消退期低表达,提示 β 2-AR 在血管瘤内皮细胞增殖及血管生成中可能起一定的作用;增生期血管瘤中,VEGF 水平明显高于消退期血管瘤。VEGF 可受 ERK/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路调控,而 PKA 又能激活 ERK/MAPK 通路^[11]。因此普萘洛尔可能通过抑制 β 1、2-AR/cAMP/PKA 信号通路对 ERK/MAPK 信号通路的激活,抑制 VEGF 的分泌,血管瘤成血管能力下降,从而达到加速血管瘤消退的效果。

参考文献

- [1] Metry D. Update on hemangiomas of infancy[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2004, 16(4): 373-377.
- [2] 马刚,林晓曦,金云波,等. 婴幼儿血管瘤发生与消退的研究进展[J]. *中华小儿外科杂志*, 2007, 28(5): 266-268.
- [3] 徐蒙. 普萘洛尔对婴幼儿血管瘤组织中血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中华全科医学*, 2013, 11(2): 222-223, 封3.
- [4] Elluru RG, Friess MR, Richter GT, et al. Multicenter Evaluation of the Effectiveness of Systemic Propranolol in the Treatment of Airway Hemangiomas[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 153(3): 452-460.
- [5] Boscolo E, Bischoff J. Vasculogenesis in infantile hemangioma[J]. *Angiogenesis*, 2009, 12(2): 197-207.
- [6] Lamy S, Lachambre MP, 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.
- [7] Greenberger S, Boscolo E, Adini I, et al. Corticosteroid suppression of VEGF-A in infantile hemangioma-derived stem cells[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(11): 1005-1013.
- [8] 赵忠芳,吕仁荣,霍然,等. 普萘洛尔治疗增生期血管瘤患儿血清中血管内皮生长因子及基质金属蛋白酶-9 的变化[J]. *中华整形外科杂志*, 2011, 27(5): 359-361.
- [9] Przewratil P, Sitkiewicz A, Andrzejewska E. Local serum levels of vascular endothelial growth factor in infantile hemangioma: intriguing mechanism of endothelial growth[J]. *Cytokine*, 2010, 49(2): 141-147.
- [10] Yang H, Deng C, Shen S, et al. Expression and significance of Bcl-2, Bax, Fas and caspase-3 in different phase of human hemangioma[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2006, 26(4): 402-404.
- [11] Fredriksson JM, Lindquist JM, Bronnikov GE, et al. Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a beta-adrenoreceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(18): 13802-13811.

收稿日期: 2015-05-10 修回日期: 2015-06-01 编辑: 王国品