

平阳霉素对大鼠脾脏组织的作用及其机制

李平, 周水森, 李兆基, 郑宏良, 沈小华, 温武

(第二军医大学长海医院耳鼻喉科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**以大鼠脾脏为模型,探讨平阳霉素治疗海绵状血管瘤的机制。**方法:**观察平阳霉素注射于大鼠脾脏后不同时间段的病理变化,采用末端转移酶介导的缺口末端标记法结合透射电镜检测凋亡,图像分析技术选择性地比较不同作用时段的凋亡率,免疫组化结合图像分析仪定量分析凋亡相关蛋白 Caspase-3 的变化。**结果:**注射生理盐水不引起大鼠脾脏结构破坏。注射平阳霉素后第 2 天、第 5 天脾脏仅有轻微肿胀;第 8 天、第 14 天呈萎缩改变,脾窦内皮细胞受损伤;注射平阳霉素后不同时间电镜检查均可见到凋亡细胞;TUNEL 标记结果显示凋亡广泛发生于脾窦内皮细胞及其他脾细胞;注射后一定时间内,凋亡率随作用时间延长而增加;Caspase-3 蛋白表达逐渐增强,与细胞凋亡的增加一致。**结论:**平阳霉素主要通过诱导脾窦内皮细胞凋亡为主,并导致一定程度的坏死,少量的成纤维细胞增生等。其发生机制是通过 Caspase-3 活化途径来诱导细胞凋亡。

[关键词] 平阳霉素;脾;血管内皮细胞;细胞凋亡;caspase-3

[中图分类号] R 978.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0178-04

Effect of Pingyangmycin on rat spleen tissue and its mechanism

LI Ping*, ZHOU Shui-miao, LI Zhao-ji, ZHENG Hong-liang, SHEN Xiao-hua, WEN Wu (Department of Otorhinolaryngology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the mechanism of Pingyangmycin in treatment of cavernous hemangioma using rat spleen as a model. **Methods:** The pathological changes of rat spleen were observed on different time points after Pingyangmycin was injected into the rat spleen. Cell apoptosis was verified with TUNEL staining and transmission electron microscope; the expression of apoptosis-related protein caspase-3 was detected with immunohistochemical method and image analysis system. **Results:** Injecting saline into rat spleen caused no damage to the spleen. Slight swelling was observed on d 2 and d 5 after Pingyangmycin was injected and the spleen became shrunk (with damaged-splenic sinus) on d 8 and d 14. Apoptotic cells were found on different days after Pingyangmycin injection under transmission electron microscope. TUNEL staining indicated that apoptotic cells existed extensively in endothelial cells of splenic sinus and others splenic cells. Apoptosis rate increased with time during a certain period of time after Pingyangmycin injection and caspase-3 expression increased gradually with the increase of apoptosis rate. **Conclusion:** Pingyangmycin causes necrosis of spleen mainly through inducing apoptosis; it can also cause necrosis and slight fibroblast cell hyperplasia. The apoptosis induction process is dependent on caspase-3 activation process.

[KEY WORDS] pingyangmycin; spleen; vascular endothelial cell; apoptosis; caspase-3

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 178-181]

平阳霉素(Pingyangmycin, PY)治疗头颈咽喉部海绵状血管瘤已有广泛的报道并取得了较好的疗效,但其机制的研究不够深入^[1]。我们以具有丰富海绵状血窦的大鼠脾脏作模型,观察了PY作用后的组织学变化,通过TUNEL结合透射电镜证实凋亡,并观察超微结构改变,图像分析技术比较不同作用时段的凋亡率,免疫组化分析凋亡相关蛋白Caspase-3在PY作用前后表达的变化,探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料 SD大鼠54只,雌雄各半,体质量250~300g,由第二军医大学实验动物中心提供。注射用盐酸PY,每支8mg加入生理盐水5ml配成注射液。TUNEL检测试剂盒、Caspase-3均为

罗氏公司产品。Axioplan 2 imaging 显微图像分析系统为德国ZEISS产品。

1.2 分组及模型制作 将大鼠随机分为9组,每组6只:空白对照组,注射生理盐水2、5、8、14d组(简称盐水组),注射PY2、5、8、14d组(简称PY组)。动物用氯胺酮、西地泮各半复合麻醉,左上腹部备皮消毒后,切开腹壁,将胃翻起显露出其背侧的脾脏,轻柔牵拉固定,用1ml的注射器沿脾脏长轴方向穿刺,注射生理盐水或PY注射液0.5ml,边注射边匀速退针,稍加压迫针孔止血,关闭切口,继续饲养。在预定的时间点,麻醉后循原切口再次开腹,游离并

[作者简介] 李平,博士,主治医师。
E-mail: liping200265@yahoo.com.cn

切断结扎脾脏周围血管,取出脾脏,肉眼观察其变化。去除脾脏头尾,将脾脏中段分割后,分别用10%中性甲醛及戊二醛溶液固定。

1.3 制备石蜡切片 将用10%中性甲醛溶液固定24 h后的标本,常规脱水、透明、石蜡包埋、切片、H-E染色,光镜观察。

1.4 末端转移酶介导的缺口 末端标记法(TdT-mediated X-Dutp nick end labeling, TUNEL)标记凋亡细胞:4 μm 石蜡切片,常规二甲苯脱蜡,0.3% H_2O_2 作用,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K 消化,TUNEL混合液反应30 min,PBS终止反应,甘油明胶封片。

1.5 Caspase-3免疫组化分析 4 μm 石蜡切片,常规二甲苯脱蜡,抗原修复,滴加特异性一抗,EnVision二抗,DAB(3,3-二甲基联苯胺)显色,苏木精衬染,盐酸乙醇分化,水洗蓝化,常规树脂封片。

1.6 显微图像分析 将各组 TUNEL 标记及 Caspase-3 免疫组化染色切片行图像分析,选取测量参数,测定阳性率和强阳性率,每组测定3张,每张切片测定3个视野并求其平均值。

1.7 透射电镜观察 标本经戊二醛溶液固定2 h后,1%锇酸固定,乙醇、丙酮逐级脱水,Epon812环氧树脂包埋,超薄切片,铀铅染色,透射电镜下观察凋亡细胞,拍照记录。

1.8 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件行多个样本均数间的多重比较。

2 结果

2.1 大体观察 空白对照组大鼠脾脏呈暗红色,表面光滑,不肿胀。盐水各时间组与空白对照组比较无明显差异。PY 2 d 组脾组织暗红色,略有轻度肿胀;PY 5 d 组脾组织暗红色,表面略凹陷,有轻度肿胀;PY 8 d 组脾脏萎缩,边缘凹凸不平,表面有白色瘢痕,与周围组织有粘连;PY 14 d 组脾脏萎缩,表面有白色瘢痕,脾脏表面凹陷,与周围组织粘连重。

2.2 光镜观察 空白对照组和盐水组脾脏表现基本一致,无明显组织学改变。PY 2 d 组脾窦扩张、充血,个别窦内皮细胞及脾索纤维细胞变性,窦内皮细胞肿胀、嗜酸性变,或细胞核浓缩、碎裂,脾索结构略模糊,少量炎细胞浸润、组织细胞增生;PY 5 d 组脾组织充血显著,脾窦扩张、充血,较多窦内皮细胞及脾索纤维细胞变性,窦内皮细胞肿胀、嗜酸性变,大量细胞核浓缩、碎裂、崩解,脾索结构模糊,较多炎细胞浸润、组织细胞增生;PY 8 d 组脾窦内皮细胞结构消失,细胞核大量溶解,纤维蛋白渗出,部分脾小体开始萎缩,纤维组织有增生,边缘充血、出血;PY

14 d 组脾小体萎缩,内皮细胞死亡,纤维组织增生,脾被膜增厚,间质含铁血黄素沉积。

2.3 TUNEL 标记及 Caspase-3 免疫组化结果 TUNEL 标记可见,阳性产物为棕黄色或呈棕褐色,位于胞质中(图 1A);空白对照组和盐水组少见阳性表达,经 PY 作用后的各组,脾窦内皮细胞凋亡增加。Caspase-3 免疫组化可见,阳性产物呈棕黄色或棕褐色,位于胞质内(图 1B),空白对照组和盐水组血窦内皮细胞很少见到阳性表达;PY 作用各组显示脾间质、淋巴细胞、血管内皮细胞均有较多的阳性颗粒分布。因第 8 天、第 14 天血窦破坏,故选取空白对照组,盐水 2、5 d 组,PY 2、5 d 组作显微图像比较分析,结果显示盐水 2、5 d 组与空白对照组比较无显著差异,PY 2、5 d 组比空白对照组和盐水 2、5 d 组显著升高($P < 0.01$,表 1)。

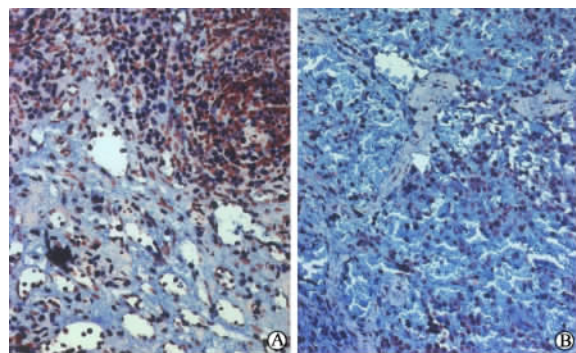


图 1 PY 作用 5 d 后脾细胞凋亡和 Caspase-3 表达情况

Fig 1 Apoptosis and Caspase-3 expression of spleen on 5 d after PY injection

A: TUNEL staining showed a lot of positive particles in the spleen sinusoid endothelial cells and the others cells. Image analysis showed a positive rate of 31.44% (the strongly positive rate was 18.36%); B: Caspase-3 positive particles were seen in the spleen sinusoid endothelial cells on 5 d after PY injection. The positive rate was 60.55% (strongly positive rate was 27.24%)

2.4 电镜检查结果 空白对照组和盐水各时间组脾血窦等结构正常。PY 2 d 组脾窦扩张、充血,个别窦内皮细胞及脾索纤维细胞变性,窦内皮细胞肿胀、嗜酸性变,或细胞核浓缩、碎裂,脾索结构略模糊,少量炎细胞浸润、组织细胞增生;PY 5 d 组脾组织充血显著,脾窦扩张、充血,较多窦内皮细胞及脾索纤维细胞变性,窦内皮细胞肿胀、嗜酸性变,大量细胞核浓缩、碎裂、崩解(图 2),脾索结构模糊,较多炎细胞浸润、组织细胞增生;PY 8 d 组脾血窦及细胞结构消失,细胞核大量溶解,边缘部分尚存细胞核,纤维蛋白渗出,部分脾小体开始萎缩,纤维组织有增生,边缘充血、出血;PY 14 d 组脾小体萎缩,脾

窦塌陷,内皮细胞及间质细胞坏死,纤维组织增生, 脾被膜增厚,间质内含铁血黄素沉积。

表 1 PY 作用后大鼠脾窦内皮细胞凋亡和 Caspase-3 表达的变化
Tab 1 Changes of apoptosis rate and Caspase-3 expression after PY injection

(n=3, $\bar{x} \pm s$, %)

Group	Apoptosis		Caspase-3	
	Positive rate	Strongly positive rate	Positive rate	Strongly positive rate
Control	13.71±2.97	5.89±1.26	24.52±1.43	4.34±1.92
Saline 2 d	15.35±1.14	6.57±0.79	23.70±1.88	4.78±0.78
Saline 5 d	14.08±2.96	5.75±1.04	23.61±2.97	4.92±1.45
PY 2 d	27.91±3.18* ^{△△▲▲}	16.16±2.41* ^{△△▲▲}	59.76±3.27* ^{△△▲▲}	32.03±0.31* ^{△△▲▲}
PY 5 d	32.50±4.07* ^{△△▲▲}	19.00±3.49* ^{△△▲▲}	63.23±3.27* ^{△△▲▲}	30.91±3.23* ^{△△▲▲}

* P<0.01 vs control; ^{△△}P<0.01 vs saline 2 d; ^{▲▲}P<0.01 vs saline 5 d

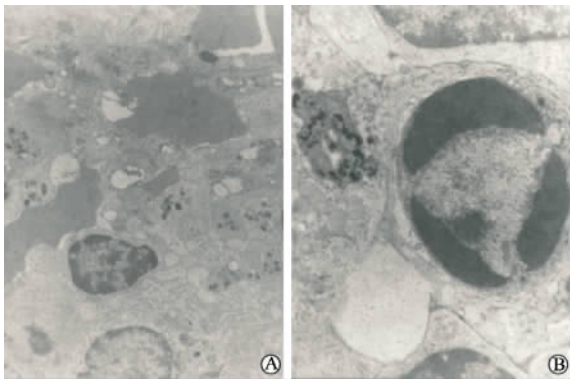


图 2 PY 作用 5 d 后脾组织的电镜图像

Fig 2 TEM image of splenic tissues 5 d after PY injection

A: The red blood cells and the blood platelet coagulated, and the thrombus formed; B: Apoptosis cells were seen in the spleen tissue

3 讨论

目前,国内外血管瘤实验研究的动物模型常采用静脉丰富迂曲的区域,如鸡冠、鼠大隐静脉、兔耳背静脉或动物的脾脏等,因脾具有丰富血窦,窦腔大、不规则,并相互通连,充满血液,窦壁由长杆状的内皮细胞沿血窦纵轴排列所构成,与海绵状血管瘤的静脉性血窦并衬有基本正常的静脉性内皮结构特点尤其类似,所以我们选用了脾脏作为研究 PY 治疗海绵状血管瘤机制的动物模型。

大体观察结合透射电镜的超微结构观察表明: PY 作用后,脾窦内皮细胞和脾组织其他细胞受损,脾窦逐渐毁损,以至于注射后第 8 天和第 14 天,光镜及电镜下已很难见到完整的脾窦结构。电镜下获得凋亡细胞特征性的形态学改变是判断细胞凋亡最可靠的依据^[2],在 PY 不同作用时段的电镜视野内均能见到各种具有凋亡形态的细胞,而空白对照组电镜下均未发现凋亡细胞;在光镜和电镜的视野中还能见到一些坏死现象,到中末期可见到少许成纤维细胞增生,可能与光镜下见到的脾脏被膜增厚、纤

维组织增生有关。

TUNEL 是原位检测凋亡最为敏感、快速、特异的方法,结果表明:在注射 PY 后 2~5 d 内,细胞凋亡增多,存在于脾窦内皮细胞、间质细胞以及淋巴细胞中,图像分析表明其凋亡率显著高于空白对照组和盐水组,与光镜和电镜观察到的脾脏结构逐渐破坏的结果一致,说明细胞凋亡是导致脾脏组织结构损伤的主要原因。

Caspase-3 是半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族的核心成员,该家族被认为是凋亡重要的发起者和执行者^[3],Caspase-3 可导致凋亡特征性的核变化——染色质凝聚、DNA 裂解^[4],临床研究证实,血管瘤内皮细胞的凋亡是 caspase 依赖的^[5]。我们对 Caspase-3 的定量分析结果表明:空白对照组 Caspase-3 呈阳性表达,可能与脾脏存在少量细胞凋亡有关^[6],但随着 PY 作用时间的延长,Caspase-3 表达逐渐增强,并与 PY 诱导细胞凋亡率的增加一致。

综上所述,PY 主要是导致脾窦内皮细胞等凋亡,并伴有一定程度的坏死、少量成纤维细胞增生等,最终导致脾窦破坏,脾脏萎缩,瘢痕形成。PY 导致细胞凋亡与 Caspase-3 的活性增加相一致,由于细胞坏死是通常不具有 Caspase-3 的活化特征的^[7],因此可以认为 PY 通过 Caspase-3 活化途径来诱导细胞凋亡。

应该注意到,临床采用 PY 注射治疗海绵状血管瘤大多数为多次反复注射,故上述作用可能更为强烈。

诱导凋亡可能成为治疗肿瘤的主要方式^[8],针对 Caspases 的治疗策略是诱导凋亡的重要手段之一^[9],PY 依赖 Caspase-3 途径诱导脾组织细胞凋亡,为我们研究血管瘤的治疗提供了新的思路,即特异性地激活 Caspase-3,以触发细胞凋亡,从而提高血管瘤内皮细胞的凋亡效率,达到使血管瘤消退的目的,避免反复使用化疗药物所导致的不良反应。

[参考文献]

[1] 李平,周水森,李兆基.头颈部血管瘤的治疗进展[J].临床耳

- 鼻咽喉科杂志,2004,18:381-384.
- [2] 高丰,金天明,姜宁,等. 细胞凋亡的研究现状与发展趋势[J]. 动物医学进展,2003,24:1-3.
- [3] Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspase[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000,64:821.
- [4] Woo M, Hakem R, Soengas MS, et al. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes[J]. Genes Dev,1998,12:806.
- [5] Takagi Y, Hattori I, Nozaki K, et al. DNA fragmentation in central nervous system vascular malformations[J]. Acta Neurochir (Wien), 2000,142(9):987-994.
- [6] Zhang Y, Chong E, Herman B. Age-associated increases in the activity of multiple caspase in Fisher 344 rat organs[J]. Exp Gerontol, 2002,37:777-789.
- [7] Vanden Berghe T, Denecker G, Brouckaert G, et al. More than one way to die: methods to determine TNF-induced apoptosis and necrosis[J]. Methods Mol Med,2004, 98:101-126.
- [8] Piro LD. Apoptosis, Bcl-2 antisense, and cancer therapy[J]. Oncology (Huntingt), 2004,18:5-10.
- [9] Adrain C, Murphy BM, Martin SJ. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the CTL/NK protease granzyme B[J]. J Biol Chem,2005,280:4663-4673.
- [收稿日期] 2005-07-20 [修回日期] 2005-11-18
[本文编辑] 孙岩