

# 平阳霉素对血管内皮细胞急性损伤后酶活性变化的实验研究

高庆红 王昌美 温玉明 肖邦良 程微波

**摘要** 目的:探讨平阳霉素损伤血管内皮细胞的机制,为临床应用提供组织学依据。方法:选用成年 Wistar 大白鼠 42 只(其中 6 只为正常对照),经肠系膜静脉分别注入平阳霉素(24 只)或鱼肝油酸钠(12 只)后,分别于注药后 0.5、1、2、4、8、24 h,切取肝脏组织,通过酶组化染色法测定肝窦内皮细胞的 5-核苷酸酶、肝细胞的琥珀酸脱氢酶(SDH)及乳酸脱氢酶(LDH)活性。结果:注入药液后,肝窦内皮细胞的 5-核苷酸酶、肝细胞的 SDH 和 LDH 活性随时间逐渐下降,其中平阳霉素组下降较轻微。结论:平阳霉素和鱼肝油酸钠都可对血管内皮细胞产生损伤,损伤的性质一样,均为非特异性,但平阳霉素损伤程度轻微,而鱼肝油酸钠严重。

**关键词** 血管内皮细胞 平阳霉素 酶活性

## An Experimental Study of Effects of Injection of Pingyangmycin on Activities of Enzyme of Endothelial Cells

Gao Qinghong, Wang Changmei, Wen Yuming, et al

The College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

### Abstract

**Objective:** The objective of this study is to investigate the mechanism of acute trauma of endothelium after injection of Pingyangmycin. **Methods:** A total of 42 adult Wistar rats were divided randomly into experimental groups (24), positive control groups (12) and normal control group (6), and the rats in the experimental or the positive control groups were injected with Pingyangmycin or sodium morrhuate into the mesenteric veins respectively, and then the enzyme activity of hepatic endothelial cells and hepatocytes was examined histochemically 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 hours after injection. **Results:** After injection, the activity of 5<sup>1</sup>-nucleinase(5<sup>1</sup>N) in hepatic endothelial cells and that of lactic dehydrogenase (LDH) and succinodhydrogenase (SDH) in hepatocytes decreased gradually, but that injected Pingyangmycin was less than that injected sodium morrhuate. **Conclusion:** The trauma caused by Pingyangmycin is less than that caused by sodium morrhuate, but the reaction of trauma caused by both is non specific.

**Key words:** endothelial cells Pingyangmycin enzyme

文献报道<sup>1~3</sup>,平阳霉素局部注射治疗血管瘤,疗效好,认为是由于平阳霉素注射后在局部高浓度积聚,损伤血管内皮细胞产生。但有关其疗效机制的系统深入研究尚少有报道。本研究目的在于通过大鼠肠系膜静脉注射平阳霉素,动态观察肝窦内皮细胞及肝细胞的酶活性变化,为平阳霉素治疗血管瘤的机制研究提供酶组织化学依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验对象及药物

选用 42 只健康成年 Wistar 大白鼠,体重约 250 g/只。

使用药物: 1 号液:8 mg 注射用盐酸平阳霉素(8 mg/支,天津市河北制药厂)溶解于 4 ml 生理盐水; 2 号液:5%鱼肝油酸钠注射液(2 ml/支,上海东海制药厂)。

#### 1.2 实验动物分组

将 42 只大鼠随机分为 6 组,7 只/组;其中实验组 24 只,注射 1 号液 0.5 ml;阳性对照组 12 只,注射 2 号液 0.3 ml;正常组 6 只,不注射药液。

#### 1.3 实验方法

注射 1 号液 0.5 ml;阳性对照组 12 只,注射 2 号液 0.3

本课题为四川大学华西口腔医学院青年基金资助项目

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院(高庆红,王昌美,温玉明),四川大学华西公共卫生学院(肖邦良,程微波)

ml;正常对照组 6只,不注射药液。

1.3.1 药物注射 将大鼠用 5% 氯氨酮经肌肉注射 (170 mg/kg) 麻醉,固定于手术架上。消毒后,切开腹部皮肤、肌肉,暴露肠系膜静脉,用 4<sub>1/2</sub> 号注射针穿刺并注射药液。注射完毕,压迫止血,分层缝合肌肉、皮肤。注射后 0.5、1、2、4、8、24 h 处死大鼠,在同一肝叶切取组织块,组成合包,立即放入液氮冷冻,恒冷切片 (8 μm),行酶组织化学试验。

1.3.2 采用铅法测定 5-核苷酸酶 (5-N) 活性 配制孵育液:10 mg 腺苷-5-单磷酸钠、8.5 ml 蒸馏水、0.2 mol/L pH 7.2 Tris-马来酸缓冲液 12.5 ml、0.1 mol/L 醋酸锰 (2%) 2.5 ml、1.5 ml 2% 硝酸铅,调 pH 至 7.2 过滤; 加孵育液完全覆盖冰冻组织切片,37 作用 30 min; 蒸馏水洗; 1% 稀硫化铵处理 1~2 min; 凉干,加拿大胶封固。

1.3.3 采用标准脱氢酶法测定琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性 配制孵育液:9 ml 硝基蓝四唑 (NBT) 贮存液、1 ml 5 mol/L 琥珀酸二钠基液; 加足量孵育液于冰冻切片上,完全覆盖组织切片,37 作用 30 min; 蒸馏水洗; 丙酮洗 3 次,每次 2 min; 凉干,加拿大胶封固。

1.3.4 采用标准脱氢酶法测定乳酸脱氢酶 (LDH) 活性 配制孵育液:9 ml NBT 贮存液、1 mol/L DL-乳酸 1 ml、20 mg 辅酶 NAD<sup>+</sup>; 加足量孵育液于冰冻切片上,完全覆盖组织切片,37 孵育; 蒸馏水洗; 丙酮洗 3 次,每次 2 min; 凉干,加拿大胶封固。

1.4 光镜观察

酶组化染色切片在光镜下观察,以着色深浅表示酶活性强弱,最强者计 4 分,强者计 3 分,较强者计 2 分,阳性计 1 分,阴性计 0 分。

1.5 统计分析方法

采用 SPSS9.0 统计软件包进行 t 检验。

2 结 果

正常对照组染色最深,计分为 4 分,其余实验组和阳性对照组各时间段染色不同,以平均数表示,结果见表 1~3。从表 1~3 可见,注射平阳霉素和鱼肝油酸钠后,随时间延长,肝窦内皮细胞 5-核苷酸酶,肝细胞 SDH、LDH 的活性均出现逐渐下降,而鱼肝油酸钠组下降更明显 (图 1~6)。

表 1 各组肝窦内皮细胞 5-核苷酸酶活性测定计分结果 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

组别	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
平阳霉素组	3.4 ±0.3 *	3.0 ±0.2 *	2.6 ±0.6	2.2 ±0.2 *	1.4 ±0.3	1.2 ±0.6
鱼肝油酸钠组	2.8 ±0.3	2.3 ±0.2	1.5 ±0.3	1.0 ±0.3	1.0 ±0.5	0.5 ±0.3

\* P < 0.05

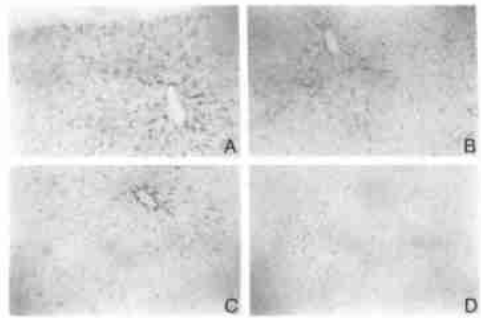


图 1 平阳霉素组肝窦内皮细胞 5-核苷酸酶的变化 金属沉淀法 ×20  
A 正常对照, B 注药后 0.5 h, C 注药后 4 h, D 注药后 8 h

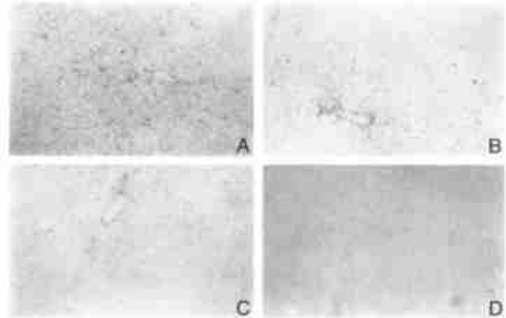


图 2 鱼肝油酸钠组肝窦内皮细胞 5-核苷酸酶的变化 金属沉淀法 ×20  
A 正常对照, B 注药后 0.5 h, C 注药后 2 h, D 注药后 4 h

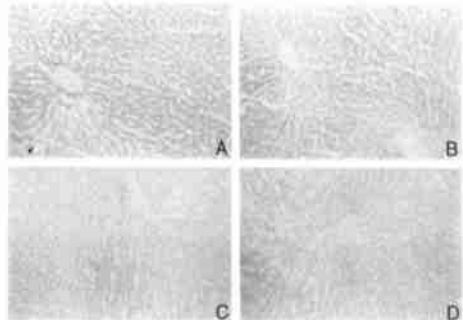


图 3 平阳霉素组肝细胞琥珀酸脱氢酶的变化 四唑盐法 ×20  
A 正常对照, B 注药后 0.5 h, C 注药后 4 h, D 注药后 24 h,以下同

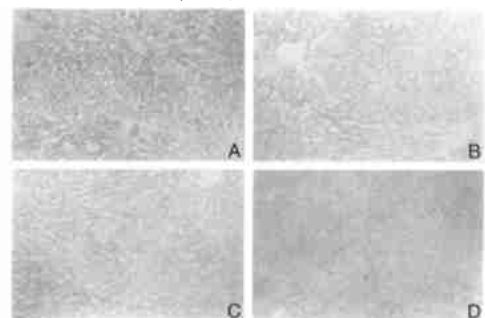


图 4 鱼肝油酸钠组肝细胞琥珀酸脱氢酶的变化 四唑盐法 ×20

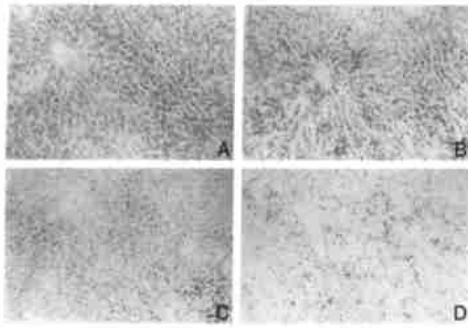


图5 平阳霉素组肝细胞乳酸脱氢酶的变化  
四唑盐法 ×20

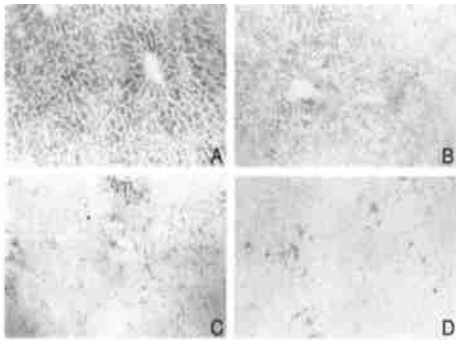


图6 鱼肝油酸钠组肝细胞乳酸脱氢酶的变化  
四唑盐法 ×20

表2 各组肝细胞琥珀酸脱氢酶活性  
测定计分结果( $\bar{x} \pm s$ ,分)

组别	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
平阳霉素组	3.8 ±0.2 *	3.0 ±0.2	2.5 ±0.3	2.3 ±0.2 *	2.0 ±0.5 *	1.0 ±0.2
鱼肝油酸钠组	3.0 ±0.2	2.5 ±0.3	2.0 ±0.2	1.5 ±0.3	0.5 ±0.3	0.5 ±0.3

\* P < 0.05

表3 各组肝细胞乳酸脱氢酶活性  
测定计分结果( $\bar{x} \pm s$ ,分)

组别	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
平阳霉素组	3.5 ±0.2	3.0 ±0.2	2.7 ±0.2 *	2.0 ±0.3	1.3 ±0.3 *	1.0 ±0.7
鱼肝油酸钠组	3.0 ±0.3	2.5 ±0.3	2.0 ±0.2	1.5 ±0.3	0.5 ±0.3	0.5 ±0.3

\* P < 0.05

### 3 讨 论

海绵状血管瘤是由许多血窦构成,血窦属静脉性血管<sup>4</sup>,有内皮并充满静脉血。大鼠肝脏血窦为

血管内皮细胞衬里,其中血流缓慢,类似于海绵状血管瘤。根据 Mulliken 和 Gowacki 的新分类<sup>5</sup>,血管畸形中静脉畸形为正常血管内皮细胞衬里,因此大鼠肝脏也可作为海绵状血管畸形的实验模型。并且大鼠肝脏中血管内皮的 5-核苷酸酶丰富,易于检测。

肝窦内皮细胞的 5-核苷酸酶定位于质膜,可能与腺苷环化酶系统有关,也可能参与核酸的降解和核苷酸的跨膜转运。实验结果表明平阳霉素降低了肝窦内皮细胞酶活性,对肝窦内皮细胞造成急性损伤,但是损伤程度不如鱼肝油酸钠严重,与临床应用一致。

SDH 定位于细胞线粒体内膜,该酶是三羧酸循环中琥珀酸氧化酶系的第一个酶,其活性降低,影响三羧酸循环的进行。而 LDH 定位于细胞质的可溶部分和线粒体,是糖酵解系统的最后一个酶,有 5 种同工酶,其中肝脏 LDH 为 LDH-5 型,主要催化丙酮酸还原为乳酸,在缺氧条件下进行。肝细胞的 SDH 和 LDH 活性均降低,表明平阳霉素和鱼肝油酸钠对肝细胞并非造成缺氧,而是非特异性损伤,因此可将平阳霉素归入硬化剂一类。

本实验结果表明,平阳霉素对肝脏血窦内皮细胞和肝细胞的酶活性有损伤作用,其对酶活性损伤的机理有待深入研究;以及多次注射是否造成细胞坏死,有待进一步观察。

### 参考文献

- 1 郑勤田,伍连康,容文星,等. 平阳霉素局部注射治疗小儿血管瘤. 中华外科杂志, 1991, 29(5): 290~291
- 2 寿柏泉,杨震,孟昭业,等. 平阳霉素治疗颌面部草莓状和混合性血管瘤 225 例的临床总结. 华西口腔医学杂志, 1995, 13(3): 198~199
- 3 王昌美,高庆红,付风华,等. 平阳霉素局部注射治疗口腔颌面部血管瘤. 华西口腔医学杂志, 2000, 18(5): 317~319
- 4 Samuel S, Steven H, Melvin S. Hemangiomas, lymphangiomas, and vascular malformations of the head and neck. Otolaryngol Clin North Am, 1986, 19(4): 769~796
- 5 Mulliken JB, Gowacki J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: A classification based on endothelial characteristics. Plast Reconstr Surg, 1982, 69(3): 412~422

(2000-08-31 收稿, 2001-04-15 修回)

(本文编辑 刘怡)