

• 实验研究 Experimental research •

核因子- κ B 和炎症反应因子对经导管动脉
栓塞术后肝细胞损伤的作用探讨

王贝然, 杜伟, 余义俊, 吴春华

【摘要】 目的 探讨经导管动脉栓塞术(TAE)后核因子(NF)- κ B 和炎症反应对兔 VX2 肝癌模型癌旁正常肝细胞的损伤作用。**方法** 采用经典开腹穿刺注入瘤块法将 VX2 肝癌移植至 70 只健康新西兰大白兔肝脏内造模, 接种后 21 d CT、MR 检查追踪肿瘤种植及生长情况。将 60 只造模成功兔随机分为 TAE 组(碘化油栓塞供血肝动脉)、造影组(仅肝动脉造影)和对照组(不作处理), 每组 20 只。免疫组化法检测 NF- κ B 在各组癌旁正常肝组织中表达, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测炎症因子肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞介素(IL)-10 在各组癌旁正常肝组织中水平。采用 SPSS 22.0 软件对数据作统计学分析, 计量资料用 t 检验, 计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。**结果** 免疫组化检测显示, TAE 组、造影组、对照组癌旁正常组织中 NF- κ B 阳性表达率分别为 75%(15/20)、35%(7/20)和 20%(4/20)。ELISA 检测显示, TAE 组、造影组、对照组 TNF- α 水平分别为 (11.72 ± 0.65) ng/L、 (9.60 ± 0.31) ng/L、 (8.82 ± 0.81) ng/L; IL-10 水平分别为 (2.18 ± 0.13) ng/L、 (1.67 ± 0.12) ng/L、 (1.66 ± 0.10) ng/L。与对照组和造影组相比, TAE 组癌旁正常肝组织中 NF- κ B 表达增加($P < 0.05$), TNF- α 和 IL-10 水平升高($P < 0.05$)。**结论** TAE 术后肝功能损伤可能与 NF- κ B 和炎症因子相互作用有关。

【关键词】 经导管动脉栓塞术; 肝癌; 核因子- κ B; 炎症反应; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-10

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2018)-08-0760-05

Discussion on the damage effect of NF- κ B and inflammatory response factor on the hepatocytes after transcatheter arterial embolization WANG Beiran, DU Wei, YU Yijun, WU Chunhua. Department of Interventional Radiology, First Affiliated Hospital of Dali University, Clinical Medical School of Dali University, Dali, Yunnan Province 671000, China

Corresponding author: DU Wei, E-mail: duweishengjia@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the damage effect of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and inflammatory response after transcatheter arterial embolization (TAE) on the normal hepatocytes adjacent to liver cancer in experimental rabbit models with VX2 hepatocellular carcinoma. **Methods** By using classical method, i.e. puncture-injection of small tumor pieces under laparotomy, VX2 liver cancer was transplanted into the liver of 70 healthy New Zealand rabbits to establish the liver cancer models. On the 21st day after inoculation, CT and MRI examinations were performed to check the implantation and growth of tumor. Successful molding was obtained in 60 rabbits, which were randomly and equally divided into three groups with 20 rabbits in each group. Embolization of hepatic artery with iodized oil was employed in TAE group, only hepatic arteriography was performed in angiography group, and no any treatment was used in the control group. Immunohistochemical method was adopted to detect the expression of NF- κ B in the normal liver tissue around the tumor of each group. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to determine the levels of inflammatory factor, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in the normal liver tissue around the tumor. Statistical analysis software package of SPSS22.0 was used to make the statistical analysis, t test was used for measurement data, χ^2 test was used for enumeration data, and $P < 0.05$ was considered to be

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2018.08.013

基金项目: 国家自然科学基金(81660300)

作者单位: 671000 云南 大理大学临床医学院、大理大学第一附属医院介入放射科

通信作者: 杜伟 E-mail: duweishengjia@126.com

statistically significant. **Results** Immunohistochemical examination indicated that the positive expression rates of NF- κ B in the normal liver tissue around the tumor in the TAE group, angiography group and control group were 75% (15/20), 35% (7/20) and 20% (4/20) respectively. ELISA examination revealed that in the normal liver tissue around the tumor in the TAE group, angiography group and control group the levels of TNF- α were (11.72 \pm 0.65) ng/L, (9.60 \pm 0.31) ng/L and (8.82 \pm 0.81) ng/L respectively, and the levels of IL-10 were (2.18 \pm 0.13) ng/L, (1.67 \pm 0.12) ng/L and (1.66 \pm 0.10) ng/L respectively. Compared with the control group and the angiography group, in TAE group the expressions of NF- κ B in the normal liver tissue around the tumor were increased ($P<0.05$), the levels of TNF- α and IL-10 were elevated ($P<0.05$). **Conclusion** The injury of liver function after TAE may be related to the interaction of NF- κ B and inflammatory factors. (J Intervent Radiol, 2018, 27: 760-764)

【Key words】 transcatheter arterial embolization; hepatocellular carcinoma; nuclear factor- κ B; inflammatory response; tumor necrosis factor- α ; interleukin-10

肝细胞癌(HCC)起病隐匿、生长快、较早发生转移,患者确诊时大多已失去外科手术切除机会,手术切除率不足 20%^[1-2]。经导管动脉栓塞术(transcatheter arterial embolization,TAE)已广泛用于治疗中晚期 HCC 患者,但术后常出现不同程度的肝脏损害,甚至发展为肝衰竭,导致死亡率上升^[3]。因此,如何减轻和避免 TAE 术对肝功能造成损害,成为改善预后的关键。研究表明核因子(nuclear factor,NF)- κ B 在细胞坏死和炎症反应发生过程中发挥着重要作用^[4],肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞介素(IL)-10 作为参与炎症反应过程的重要炎症因子亦受到 NF- κ B 调控^[5-6]。本研究通过建立兔 VX2 肝癌模型并行 TAE 治疗观察癌旁组织中 NF- κ B 表达以及 TNF- α 、IL-10 含量变化,探讨它们在 TAE 后肝细胞损伤中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要器材

后腿皮下荷 VX2 瘤兔 2 只(东南大学附属中大医院惠赠),健康新西兰大白兔 70 只(大理大学实验动物中心提供),体质量为(2.8 \pm 0.28) kg,雌雄不拘,普通饲料喂养。

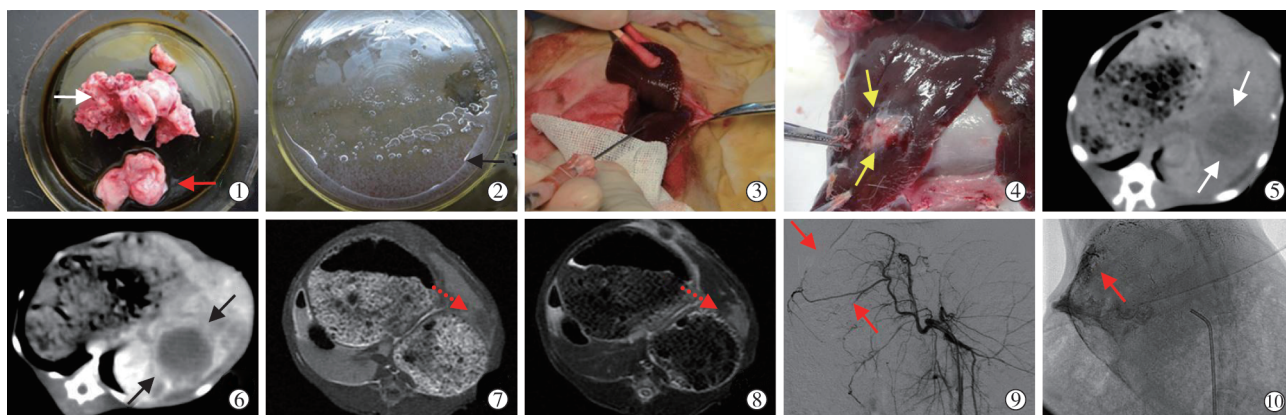
主要实验器材包括 Philips 16 排螺旋 CT 机、Toshiba TITAN 3.0T 型 MR 机、GE Innova-3100IQ 型 DSA 机、自制实验兔手术台、自制小洞巾、各型号注射器、3%戊巴比妥钠、硫酸庆大霉素注射液、0.9%氯化钠溶液、碘化油、碘海醇、眼科剪、眼科镊、培养皿、超净台、动脉夹、18 G 穿刺针、4 F 导管鞘、3 F SP 微导管、微导丝、NF- κ B 鼠抗兔多克隆抗体(武汉博士德公司)、二抗(抗鼠/兔)试剂及二氨基联苯胺(DAB)显色试剂(丹麦 Dako 公司)以及 IL-10、TNF- α 兔双抗夹心法检测试剂盒(上海古朵生物科技有限公司)。

1.2 兔 VX2 肝癌模型制作

随机选取荷瘤种兔 1 只,经耳缘静脉推注 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉(本实验均采用此麻醉方法)并固定,于后肢肿瘤处常规备皮、消毒,切开表皮,剥离肿块并将周边坏死组织清理干净,最后将边缘生长旺盛的鱼肉样肿瘤组织置于含 50 mL 0.9%氯化钠溶液和 2 万 U 庆大霉素混合液培养皿中,用眼科剪将瘤块剪成约 1 mm³ 碎块(图 1①②);1 mL 注射器抽吸瘤粒混合液(15~20 个瘤粒/mL)后套用 18 G 穿刺针送至健康兔后腿皮下,以保种传代;将实验兔麻醉固定,备皮、消毒并铺巾,剑突下正中偏左侧纵向切开腹部,充分暴露肝脏,用眼科镊将肝左叶完整拉出,1 mL 注射器换用 18 G 穿刺针呈 30°斜穿刺入肝脏 1.5~2 cm,回抽未见血液及胆汁回流后注入瘤粒混合液 1 mL(图 1③)并迅速用明胶海绵填塞穿刺通道,腹腔内洒入庆大霉素 40 万 U,纱布压迫穿刺点止血 3~5 min,无渗血后将肝脏放回腹腔内,关闭并缝合腹腔切口。为预防感染,术后连续 3 d 肌内注射庆大霉素 40 万 U^[7]。

1.3 实验模型分组及处理

造模后 21 d 分别行 CT、MR 检查追踪肿瘤种植及生长情况(图 1④~⑧)。共计造模成功 60 只,造模成功率 87%(60/69)。将 60 只 VX2 肝癌模型兔随机分为 TAE 组(碘化油 0.2 mL 栓塞供血肝动脉)、造影组(仅行肝动脉插管造影)(图 1⑨⑩)和对照组(不作处理),每组 20 只。兔全身麻醉后固定于操作台上,右腹股沟附近 10 cm 范围内备皮、消毒后皮肤切一小口,用 18 G 穿刺针穿刺进入股动脉后引入导丝,拔去穿刺针后引入 4 F 导管鞘,经导管鞘放入 4 F 导管,通过导丝选入腹腔干;3 F 微导管通过 4 F 导管超选入肝总动脉,造影明确肿瘤供血动脉;进一步超选至肿瘤供血动脉作造影,可看到肿瘤区



①鱼肉样 VX2 肿瘤组织;②瘤粒与庆大霉素混合液;③经肝左叶穿刺行瘤灶种植;④肝左叶瘤灶种植成功;⑤造模后 3 周 CT 平扫示肝左叶类圆形低密度占位;⑥CT 增强扫描示肿瘤周边强化;⑦MR 示肝左叶占位在 T1 加权成像呈低信号改变;⑧MR 示肝左叶占位在 T2 加权成像呈稍高信号改变;⑨实验兔腹腔干造影示肿瘤供血肝动脉分支较多且走行紊乱,血管推移呈“抱球征”,有肿瘤染色(箭头);⑩TAE 术后 X 线平片示肿瘤区有碘油沉积

图 1 兔 VX2 肝癌模型制作与实验处理影像

出现“抱球征”,通过 3 F 微导管推注碘化油后用明胶海绵栓塞,术毕按压穿刺点 15 min。

1.4 实验标本存取

TAE 术和造影完成后 24 h,3 组实验兔均统一处死,左上腹剑突下腹正中切口切取完整肝脏,分离瘤组织与周围正常肝组织,选取癌旁正常肝组织(距肿瘤>2 cm)^[8];对分离出的各组癌旁组织标本作标记,放入 5 mL 塑料试管经液氮罐冷却,12 h 后转移至-80℃冰箱保存备用。

1.5 NF-κB 表达判定

将实验标本固定后行石蜡包埋,切片后用 EnVision™ 两步法免疫组化法作 NF-κB 苏木精-伊红(HE)染色,具体步骤按照说明书进行。每张切片于 400 倍镜下选取 10 个视野,依据细胞阳性表达数与被检测蛋白表达部位阳性信号强度作出综合评分。细胞阳性表达数计分:阳性表达细胞<5%为 0 分,5%~25%为 1 分,>25%~50%为 2 分,>50%为 3 分;阳性信号强度计分:细胞无染色为 0 分,染成淡黄色为 1 分,染成黄棕色为 2 分,染成深棕色为 3 分。将细胞阳性表达数评分和阳性信号强度评分相加之和,作为判定结果标准:<2 分为阴性(-)表达,2~3 为弱阳性(+)表达,4~5 分为阳性(++)表达,6~7 分为强阳性(+++)表达。

1.6 TNF-α、IL-10 蛋白含量检测

采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测标本中 TNF-α、IL-10 蛋白水平,具体步骤按照试剂盒说明书进行。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对全部数据进行统计学分

析。计量资料用 *t* 检验,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

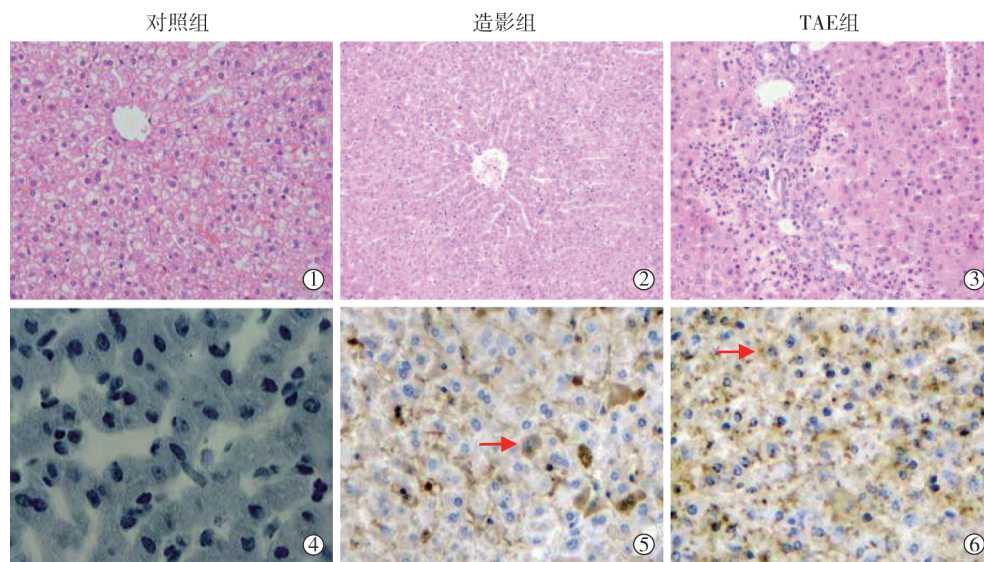
2 结果

免疫组化分析结果显示,TAE 组、造影组、对照组癌旁正常组织中 NF-κB 阳性表达率分别为 75% (15/20)、35% (7/20) 和 20% (4/20);各组数据卡方检验显示,造影组与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),TAE 组与造影组差异有显著统计学意义($P < 0.001$),TAE 组与对照组差异有统计学意义($P = 0.011$),见图 2、表 1。

ELISA 检测显示,TNF-α、IL-10 值在 TAE 组最高,高于造影组,对照组最低;方差分析对比显示,造影组与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),TAE 组与对照组差异有统计学意义($P < 0.05$),TAE 组与造影组差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

3 讨论

肝动脉和门静脉为肝脏提供双重血供,动脉血流阻塞时门静脉可代偿供血,以维持肝脏正常功能。约 99% 肝肿瘤由肝动脉供血,这为 TAE 治疗 HCC 提供了理论支持^[9],因此 TAE 为无法外科手术治疗的中晚期 HCC 患者提供了另一处理方案,有助于延长患者生命周期,提高生存率。然而即使采用超选栓塞治疗,TAE 依旧会对肝脏造成损伤。由于肝血窦及肝内侧支循环丰富等特征,栓塞剂不可避免地进入癌旁正常肝组织并沉积于微小动脉和毛细血管,引起组织缺血缺氧,从而刺激肝组织产



①~③癌旁肝组织 HE 染色($\times 40$)示 TAE 组汇管区及肝小叶周边见大量中性粒细胞浸润,明显多于造影组、对照组;④~⑥TAE 组癌旁肝组织 NF- κ B 表达($\times 400$)明显高于造影组、对照组

图 2 3 组癌旁肝组织 HE 染色与 NF- κ B 表达

表 1 NF- κ B 在癌旁肝组织中表达

| 组别 | NF- κ B 表达情况/n | | | | 阳性率/% |
|-------------|-----------------------|---|----|-----|-------|
| | - | + | ++ | +++ | |
| 对照组(n=20) | 16 | 1 | 2 | 1 | 20 |
| 造影组(n=20) | 13 | 2 | 3 | 2 | 35 |
| TAE 组(n=20) | 5 | 2 | 6 | 7 | 75 |

表 2 癌旁组织中 TNF- α 、IL-10 测定值 ng/L

| 组别 | TNF- α | IL-10 |
|-------------|--------------------|--------------------|
| 对照组(n=20) | 8.82 \pm 0.81 | 1.66 \pm 0.10 |
| 造影组(n=20) | 9.60 \pm 0.31* | 1.67 \pm 0.12* |
| TAE 组(n=20) | 11.7 \pm 0.65**# | 2.18 \pm 0.13**# |

注: *造影组与对照组比较, $P>0.05$; **TAE 组与对照组比较, $P<0.05$; #TAE 组与造影组比较, $P<0.05$

生大量活性氧和炎症因子,引发一系列复杂的内源性反应,导致肝细胞坏死、肝功能损伤^[10],影响患者预后。

炎症反应是临床最常见病理生理过程之一,可发生于机体任何器官和组织,急性炎症时发生红、肿、热、痛等变化,且时常伴随发热、白细胞增多等全身症状。炎症反应实质是以 TNF- α 为代表的致炎因子与以 IL-10 为代表的抗炎因子之间全面抗争的自我保护过程,其分歧抗争贯穿炎症反应过程始终^[11-12]。TNF- α 主要来源于单核巨噬细胞,一方面与 TNF- α 受体结合,破坏溶酶体致使酶外露而损伤组织,另一方面通过诱导组织上皮细胞活化,增高毛细血管通透性致使水肿液聚集阻碍细胞灌注和气体交换而加重组织损伤^[13]。鉴于 TNF- α 强烈的毒性作用,其在 TAE 后肝组织损伤中可能起到助推器作用。IL-10 则主要来自单核-巨噬细胞和辅助性 T 细

胞,通常具有抗炎和免疫调节双重作用,能直接对 endothelial 细胞和巨噬细胞等多种细胞产生强烈的抗炎和免疫抑制作用,减轻组织损伤^[14]。机体受到各种原因所致刺激时,一方面致炎因子 TNF- α 等含量会增加,使局部组织细胞变性、坏死,发生损伤,另一方面通过激发抗炎因子 IL-10 释放发挥机体抵抗疾病的潜能,以利于更好地清除致炎因子,修复损伤组织,从而使机体恢复至正常状态^[15]。如果促炎与抗炎双方旗鼓相当,那么机体内环境就会相对平稳,损伤最终得以修复;相反,如果其中任何一方由于失控而表达过度,平衡就会打破,从而加重器官或组织损伤^[16]。本研究发现 TAE 组汇管区及肝小叶周边见大量中性粒细胞浸润(图 2①~③),提示癌旁组织发生了严重损伤,而 TAE 组癌旁组织中 TNF- α 和 IL-10 浓度明显升高,推测可能是 TAE 术中各种原因引起癌旁组织缺血缺氧,导致了炎症反应发生。

NF- κ B 是由 p105、p100、p50、p52、RelA/p65、c-Rel 和 RelB 等 7 种蛋白组成的发挥转录活性功能的二聚体,正常生理状态下主要分布在细胞质中,与其抑制蛋白 I κ B α 结合而不发挥转录功能。当细胞受到 TNF- α 、IL-10、缺血缺氧等致炎因素刺激时, I κ B α 发生氧化磷酸化被降解, NF- κ B 便失去束缚,进入细胞核中发挥转录活性功能,调控其下游多种炎症因子反应,对机体产生保护效应^[17-19]。Chandra 等^[20]研究发现,严重缺血缺氧会导致 NF- κ B 活化过度,使下游炎症因子 TNF- α 表达增强,进一步刺激

IL-10 合成,使炎症反应过程中促炎、抗炎平衡被打破,引起细胞坏死,最终导致组织损伤。本研究结果表明,与对照组和造影组相比,TAE 组癌旁组织中 NF- κ B 阳性表达率明显升高,与上述观点一致。

综上所述,TAE 术后癌旁肝组织功能损伤可能是术中栓塞剂进入癌旁肝组织引起缺血缺氧,NF- κ B 活化过度并调控下游炎症因子 TNF- α 和 IL-10 使其合成增多,破坏了炎症反应过程中促炎、抗炎平衡所致。因此,在今后临床实践中,可将 NF- κ B 作为保护肝功能的靶点,通过抑制其过度表达减少 TNF- α 和 IL-10 过度释放,尽可能减少甚至避免炎症反应过程中促炎、抗炎失衡发生,从而减轻对癌旁正常肝细胞的损伤,保护患者术后肝脏储备功能,提高生存率。

[参考文献]

- [1] Sun H, Han B, Zhai H, et al. Significant association between MTHFR C677T polymorphism and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35: 189-193.
- [2] 刘 丽, 邵天朋, 杨 涛, 等. 经动脉灌注 rAd-p53 联合 TAE 治疗中晚期肝癌的疗效观察[J]. *介入放射学杂志*, 2016, 25: 210-213.
- [3] Liang YJ, Yu H, Feng G, et al. High-performance poly (lactic-co-glycolic acid)-magnetic microspheres prepared by rotating membrane emulsification for transcatheter arterial embolization and magnetic ablation in VX2 liver tumors[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 43478-43489.
- [4] Lu D, Abulimiti A, Wu T, et al. Pulmonary surfactant-associated proteins and inflammatory factors in obstructive sleep apnea[J]. *Sleep Breath*, 2018, 22: 99-107.
- [5] Epanchintsev A, Shyamsunder P, Verma RS, et al. IL-6, IL-8, MMP-2, MMP-9 are overexpressed in Fanconi anemia cells through a NF- κ B/TNF- α dependent mechanism[J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54: 1686-1699.
- [6] 胡建英, 王雅敏, 李峤珂. 孟鲁司特钠对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠 NF- κ B, TNF- α mRNA 表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37: 5264-5267.
- [7] 朱先海, 王伟昱, 施长杲, 等. 温控射频消融治疗 VX2 肝癌实验研究[J]. *介入放射学杂志*, 2016, 25: 56-60.
- [8] 徐 涛, 陈孝平, 李 丹, 等. CD147 在兔 VX2 模型肿瘤组织的表达及意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24: 37-39.
- [9] Miki I, Murata S, Uchiyama F, et al. Evaluation of the relationship between hepatocellular carcinoma location and transarterial chemoembolization efficacy[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23: 6437-6447.
- [10] 郭欢庆, 陈赤丹, 闫 鹏, 等. 超选择性肝动脉栓塞术治疗多囊性肝病初步研究[J]. *介入放射学杂志*, 2015, 24: 676-679.
- [11] Chen L, Deng H, Cui H, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs[J]. *Oncotarget*, 2018, 9: 7204-7218.
- [12] Seleme MC, Kosmac K, Jonjic S, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced recruitment of inflammatory mononuclear cells leads to inflammation and altered brain development in murine cytomegalovirus-infected newborn mice[J]. *J Virol*, 2017, 91: e01916-e01983.
- [13] Khoshdel A, Kheiri S, Omidvari P, et al. Association between interleukin-10-1082 G/A and tumor necrosis factor- α 308 G/A gene polymorphisms and respiratory distress syndrome in Iranian preterm infants[J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 6386453.
- [14] Men T, Yu C, Wang D, et al. The impact of interleukin-10(IL-10) gene 4 polymorphisms on peripheral blood IL-10 variation and prostate cancer risk based on published studies[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 45994-46005.
- [15] Palacz-Wrobel M, Borkowska P, Paul-Samojedny M, et al. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10(IL-10) in RAW-264.7 macrophages[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1205-1212.
- [16] Zhang Y, Hu F, Wen J, et al. Effects of sevoflurane on NF- κ B and TNF- α expression in renal ischemia-reperfusion diabetic rats[J]. *Inflamm Res*, 2017, 66: 901-910.
- [17] Bakhtiari E, Hosseini A, Boroushaki MT, et al. Angiotensin II receptor antagonist olmesartan and NF- κ B inhibitor as cytotoxic and apoptotic agents in MCF-7 human cell line[J]. *J Chemother*, 2016, 28: 314-320.
- [18] Li W, Wang X, Niu X, et al. Protective effects of nobilentin against endotoxic shock in mice through inhibiting TNF- α , IL-6, and HMGB1 and regulating NF- κ B pathway[J]. *Inflammation*, 2016, 39: 786-797.
- [19] Hou J, Jiang S, Zhao J, et al. N-Myc-Interacting protein negatively regulates TNF- α -induced NF- κ B transcriptional activity by sequestering NF- κ B/p65 in the cytoplasm[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 14579.
- [20] Chandra K, Gogia A, Kakar A, et al. To study co-relation of inflammatory marker TNF- α in diabetic mellitus patients and healthy nondiabetic adults[J]. *Curr Med Res Pract*, 2016, 6: 8-11.

(收稿日期:2018-02-07)

(本文编辑:边 佑)