

## • 实验研究 Experimental research •

经导管动脉化疗栓塞和微波消融治疗 VX2 肝癌  
诱导低氧诱导因子-1 $\alpha$  调节糖酵解与微血管密度  
相关性分析研究

秦焕蓉, 程芝梅, 吴祥锴, 何慧州, 郭韵涵, 王黎洲, 张 帅, 周 石

**【摘要】 目的** 探讨经导管动脉化疗栓塞术(TACE)和微波消融(MWA)治疗 VX2 肝癌诱导的低氧诱导因子(HIF)-1 $\alpha$  糖酵解与微血管密度相关性。**方法** 选取 19 只新西兰兔,建立 18 只 VX2 肝癌模型。随机分为对照组(建模不做处理, $n=6$ )、TACE 组(经肝动脉注射碘化油和吡柔比星乳剂, $n=6$ )、MWA 组(经皮穿刺肿瘤后行 MWA, $n=6$ )。肿瘤长至 1.5~2 cm 时行相应手术治疗。术后 2 周处死实验兔,取肿瘤及瘤周些许肝组织。苏木精-伊红(HE)染色观察肿瘤细胞形态。免疫组化检测肿瘤 HIF-1 $\alpha$ 、微血管密度(CD34、CD105 标记)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、Ki67 表达。蛋白质印迹实验检测糖酵解关键酶己糖激酶(HK)2、丙酮酸激酶(PK)M2、乳酸脱氢酶(LDH)A、葡萄糖转运体(GLUT)1、GLUT4 及丙酮酸脱氢酶激酶(PDK)1 蛋白表达。**结果** 18 只兔均建模成功,手术成功率为 100%。HE 染色显示肿瘤细胞排列紊乱。免疫组化检测显示,TACE 组、MWA 组与对照组相比,HIF-1 $\alpha$ 、CD34、CD105、VEGF 及 Ki67 表达升高(均  $P<0.05$ );蛋白印迹实验分析显示,与对照组相比,TACE 组、MWA 组后 GLUT1、GLUT4 表达升高(均  $P<0.05$ );PKM2、HK2 表达量 MWA 组升高(均  $P<0.05$ ),但 TACE 组的差异无统计学意义(均  $P>0.05$ );LDHA、PDK1 表达量 TACE 组升高(均  $P<0.05$ ),但 MWA 组的差异无统计学意义(均  $P>0.05$ )。Pearson 相关性分析结果表明,肿瘤内微血管密度与糖酵解代谢呈正相关。**结论** TACE 和 MWA 治疗后 VX2 肝癌模型糖酵解代谢上调,且与肿瘤血管新生正相关。

**【关键词】** 肝肿瘤;经导管动脉化疗栓塞术;微波消融;兔;模型;糖酵解

中图分类号:R657.3 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2024)-04-0390-07

**Correlation between HIF-1 $\alpha$  regulation of glycolysis and microvessel density induced by transcatheter arterial chemoembolization and microwave ablation in experimental rabbits with VX2 hepatocellular carcinoma** QIN Huanrong, CHENG Zhimei, WU Xiangkai, HE Huizhou, GUO Yunhan, WANG Lizhou, ZHANG Shuai, ZHOU Shi. School of Imaging, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

Corresponding author: ZHOU Shi, E-mail: zhoushi@gmc.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the correlation between HIF - 1 $\alpha$  regulation of glycolysis and microvessel density induced by transcatheter arterial chemoembolization (TACE) and microwave ablation (MWA) in experimental rabbits with VX2 hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** Nineteen New Zealand rabbits were selected, and VX2 HCC model was successfully established in 18 rabbits. The 18 rabbits with VX2 HCC were randomly divided into control group (no any treatment was given after modeling,  $n=6$ ) and TACE group (receiving TACE with iodized oil and pirobicin emulsion, $n=6$ ), and MWA group(receiving MWA,  $n=6$ ). When the tumor of experimental rabbits grew to 1.5–2 cm size, the corresponding treatment started. The experimental rabbits were sacrificed two weeks after the treatment, the tumor and a few peritumoral liver tissues were removed and sent for laboratory testing. Tumor cell morphology was examined by hematoxylin-eosin (HE) staining. Immunohistochemical assay was used to detect the hypoxia-inducing factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), microvascular

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2024.04.009

基金项目: 国家自然科学基金(81960328、82202283)

作者单位: 550004 贵州贵阳 贵州医科大学影像学院(秦焕蓉、程芝梅、吴祥锴、何慧州、郭韵涵);贵州医科大学附属医院介入科(王黎洲、张 帅、周 石)

通信作者: 周 石 E-mail: zhoushi@gmc.edu.cn

density (CD34, CD105 markers), vascular endothelial growth factor (VEGF), and Ki67 expression. Western blot was used to detect the expressions of key glycolytic enzymes hexokinase 2 (HK2), pyruvate dehydrogenase 2 (PKM2), lactate dehydrogenase (LDHA), glucose transporter (GLUT1 and GLUT4), and pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1). The correlation between glycolysis and tumor microvascular density was evaluated by Pearson correlation analysis. **Results** A total of 18 rabbits were successfully modeled, the surgical success rate was 100%. HE staining examination demonstrated that the arrangement of the tumor cells was disorganized. Immunohistochemical assay indicated that in TACE group and MWA group the expressions of HIF-1 $\alpha$ , CD34, CD105, VEGF, and Ki67 were remarkably elevated when compared with the control group (all  $P < 0.05$ ). Western blot analysis revealed that when compared with the control group in TACE group and MWA group the expressions of GLUT1 and GLUT4 were obviously elevated (both  $P < 0.05$ ); the expressions of PKM2 and HK2 were higher in MWA group (both  $P < 0.05$ ), but no significant difference in TACE group (both  $P > 0.05$ ); and the expressions of LDHA and PDK1 were higher in TACE group (both  $P < 0.05$ ), but no significant difference in MWA group (both  $P > 0.05$ ). Pearson correlation analysis showed that a positive correlation existed between the microvessel density and glycolytic metabolism in the tumor. **Conclusion** After receiving TACE and MWA treatment, in rabbit VX2 HCC models the glycolytic metabolism becomes up-regulated, which bears a positive relationship to tumor angiogenesis. (J Intervent Radiol, 2024, 33: 390-396)

**【Key words】** hepatocellular carcinoma; transcatheter arterial chemoembolization; microwave ablation; rabbit; model; glycolysis

肝癌是亚洲第五大常见癌症<sup>[1]</sup>,其中肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见组织学类型<sup>[2]</sup>。目前经导管动脉化疗栓塞术 (transcatheter arterial chemoembolization, TACE) 是中晚期 HCC 患者一线治疗方案<sup>[3-4]</sup>,但其复发频率较高。有研究表明,HCC 患者 TACE 术后低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) - 1 $\alpha$  表达上调。微波消融 (microwave ablation, MWA) 作为肝癌局部治疗方法之一,被推荐用于治疗孤立的 3~5 cm HCC,尤其是门静脉高压或肝功能储备不良患者<sup>[5]</sup>,但术中很难实现完全消融,导致肝癌复发。MWA 术后未完全坏死肿瘤组织中 HIF-1 $\alpha$  和血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 表达上调,是导致肿瘤复发转移的主要原因<sup>[6-7]</sup>。HIF-1 $\alpha$  可上调微血管与糖酵解相关基因<sup>[8]</sup>,促进肿瘤内微血管增生及糖酵解代谢。关于 TACE 和 MWA 术后糖酵解与微血管密度间关系的报道鲜见,因此本研究通过建立兔 VX2 肝癌模型,分析 TACE 和 MWA 治疗后肿瘤组织中糖酵解关键酶表达及肿瘤内血管新生生物标记、代表肿瘤增殖情况的 Ki67 蛋白表达变化,以探究 TACE 和 MWA 术后糖酵解代谢与微血管密度间关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

19 只雄性新西兰兔,2 个月龄,体质量 2~3 kg,购自贵州医科大学动物实验中心(动物许可证号:

SYXK 黔 2018-0001)。适应性喂养 1 周后开始做实验,1 只做荷瘤兔,18 只用于构建 VX2 兔肝癌模型。

### 1.2 主要仪器和试剂

KY-2000 型 MWA 治疗仪(南京康友医疗科技公司),Axiomart FA 型 DSA 机(德国 Siemens 公司),吡柔比星(浙江瀚辉制药公司),异氟烷(深圳瑞沃德生命科技公司),研磨株(3 mm、4 mm,北京索莱宝科技公司),Western 及 IP 裂解液(上海碧云天生物技术公司),一步法聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)制备试剂盒(10%)(上海雅酶生物科技有限公司),鼠源 HIF-1 $\alpha$  (美国 Invitrogen 公司),丙酮酸脱氢酶激酶(PDK)1 (江苏亲科生物研究中心公司,批号 57k5142),驴源丙酮酸激酶(PK)M2(美国 Novus 生物制品公司),乳酸脱氢酶(LDH)A(美国 Invitrogen 公司),己糖激酶(HK)2、葡萄糖转运体 (GLUT)1 兔单克隆抗体、GLUT4 (美国 Cell Signaling Technology 公司),3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)兔单克隆抗体(北京博奥森生物科技公司),VEGF、CD34、CD105 及 Ki67 抗体(湖南艾方生物科技公司),羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗、驴抗羊二抗(武汉三鹰生物技术公司),二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司),蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司),增强型电化学发光(ECL)试剂(江苏亲科生物研究中心公司),SMZ800N 光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

### 1.3 兔 VX2 肝癌模型制备

将 VX2 瘤组织接种于 1 只兔大腿外侧肌肉内,

M6Vet 超声诊断仪(迈瑞医疗器械公司)监测肿瘤生长。约 2 周后将该荷瘤兔置于麻醉箱中行全身麻醉,无菌条件下分离肿瘤组织,剪碎至  $0.5 \sim 1 \text{ mm}^3$  大小,超声引导下经皮穿刺将 VX2 瘤组织植入兔肝脏构建 VX2 肝癌模型<sup>[9]</sup>。肿瘤长至  $1.5 \sim 2 \text{ cm}$  时行相应手术治疗。

#### 1.4 TACE

建模后约 2 周,Aixplorer 彩色超声仪(法国 SuperSonic Imagine 公司)测量肿瘤大小,肿瘤呈椭圆形,实性回声(图 1①)。术前禁食 8 h、禁水 4 h。经模型兔鼻锥持续吸入 3%异氟烷诱导麻醉,用绷带将兔固定于 DSA 检查床;沿右股动脉纵行切开皮肤,剥离股动脉,穿刺成功后导入导管(145-5091-150,美国 Micro Therapeutics 公司)及导丝(M001508110, FATHOMTM-14,美国 Boston 科技公司)(图 1②)选择性行肝固有动脉造影,观察肿瘤供血几乎完全源于肝左动脉(图 1③);透视下经导管注入碘化油  $2 \text{ mg/mL}$  和毗柔比星乳剂  $0.5 \text{ mL}$ ,至全部剂量注射完毕。对照(Control)组建模不做处理。术后恢复实验兔饮食,观察一般状态;对感染兔肌肉注射青霉素( $30 \text{ 万 U/d}$ ),连续 3 d。

#### 1.5 MWA

术前实验兔禁食 8 h。异氟烷持续诱导麻醉后,兔平躺固定于手术台;超声引导下消融针经皮穿刺插入肿瘤(图 1④⑤)行消融(输出功率设置为  $45 \text{ W}$ ,持续  $1 \text{ min}$ );消融完毕可见肿瘤回声增强(图 1⑥),为防止针道出血和肿瘤播散沿针道行热凝术。

#### 1.6 血清肝功能指标检测

术前 1 d 及术后 2 周,从实验兔耳背动脉采血,  $3\ 000 \text{ r/min}$  离心  $15 \text{ min}$  后取上清;检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)。

#### 1.7 病理检测

术后 2 周全身麻醉处死实验兔,取肿瘤及瘤周些许肝组织,多聚甲醛固定液中固定 1 d 后,梯度乙醇脱水、二甲苯通透及浸腊后包埋制成石蜡包块,切片行苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察肿瘤细胞形态变化;行免疫组化,在一抗/二抗孵育后,

DAB 显色检测 HIF- $1\alpha$ 、Ki67 以及微血管密度(CD34、CD105 标记)、VEGF 表达,Image J 定量蛋白表达。细胞染色强度分级:0 级为阴性,无细胞着色;1 级为弱阳性,细胞颜色淡黄色;2 级为中性,细胞呈棕黄色;3 级为强阳性,褐色细胞着色。计算公式:  $IS = \sum [(0 \times F_0) + (1 \times F_1) + (2 \times F_2) + (3 \times F_3)]$ ,其中 F 为各层染色强度之细胞数占视野内细胞总数百分比,数字表示染色强度等级<sup>[7]</sup>。采用 Pearson 相关性分析评价糖酵解代谢与血管新生的关系。

#### 1.8 蛋白质印迹实验

从各组取未坏死部分肿瘤组织,每  $20 \text{ mg}$  组织加  $100 \mu\text{L}$  裂解液(Western 及 IP 裂解液:磷酸酶抑制剂=100:1),加入研磨珠 2 大( $4 \text{ mm}$ )、3 小( $3 \text{ mm}$ )冰上裂解  $30 \text{ min}$ ;每  $5 \text{ min}$  振荡 1 次,研磨机  $60 \text{ Hz}$  频率研磨 15 次;超声破碎  $3 \text{ s/次}$ ,  $12\ 000 \text{ r/15 min}$  离心取上清,二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度;10%PAGE 分离蛋白并转移至聚偏二氟乙烯膜,5%脱脂奶粉室温封闭  $1 \text{ h}$ ,加入 GAPDH、GLUT1、GLUT4、HK2、PKM2、PDK1 及 LDHA 一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜,二抗室温孵育  $1 \text{ h}$ ;ECL 发光液孵育约  $30 \text{ s}$ ,GeneGnome 化学发光凝胶成像仪收集图像,Image J 分析条带灰度值。

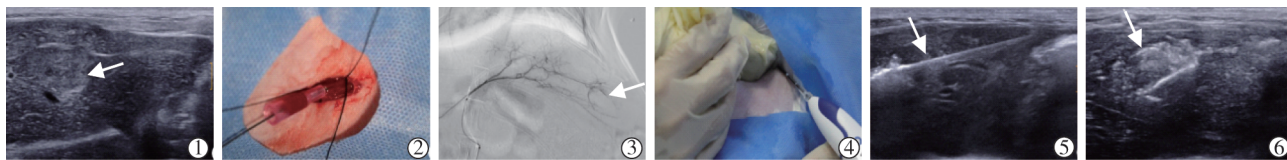
#### 1.9 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件分析实验数据。符合正态分布计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,3 组比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD- $t$  检验。采用 Pearson 相关性分析评价肿瘤组织免疫组化与蛋白质印迹实验结果的关系。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 VX2 肝癌手术一般情况

18 只兔均建模成功,手术成功率为 100%。超声检查显示肿瘤呈椭圆形,实性回声。术前 TACE 组、MWA 组、对照组间兔体质量比较差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ ),术后 2 周 TACE 组、MWA 组低于对照组(均  $P < 0.01$ ),见表 1;术前 3 组间血清 ALT、



①超声测量示肝癌呈椭圆形,实性回声(箭头);②TACE 穿刺股动脉成功后导入导管导丝;③肝固有动脉造影显示其分支增多紊乱,包绕肿瘤,呈“抱球征”(箭头)。④⑤超声引导下 MWA 术穿刺,可见穿刺针呈高回声(箭头),穿刺针尖端肿瘤回声增强;⑥消融完毕肿瘤呈高回声(箭头)

图 1 兔 VX2 肝癌模型建立及 TACE 和 MWA 治疗过程



AST 比较差异无统计学意义(均  $P>0.05$ ), 术后 2 周 TACE 组、MWA 组 ALT、AST 高于对照组(均  $P<0.01$ ), 见表 2。

表 1 3 组实验兔术前和术后 2 周体重比较(kg,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	术前	术后 2 周
对照组	2.50±0.14	2.41±0.19
TACE 组	2.55±0.18	2.29±0.16 <sup>a</sup>
MWA 组	2.46±0.15	2.20±0.13 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> 与对照组相比, 均  $P<0.01$

表 2 3 组实验兔术前和术后 2 周 ALT、AST 比较(U/L,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	ALT		AST	
	术前	术后 2 周	术前	术后 2 周
对照组	41.32±7.13	55.32±9.43	38.26±11.58	33.82±10.80
TACE 组	40.12±10.29	132.10±70.14 <sup>a</sup>	35.80±9.72	152.39±89.55 <sup>a</sup>
MWA 组	41.47±11.08	126.30±65.28 <sup>b</sup>	39.16±8.32	155.42±84.67 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> 与对照组相比, 均  $P<0.01$

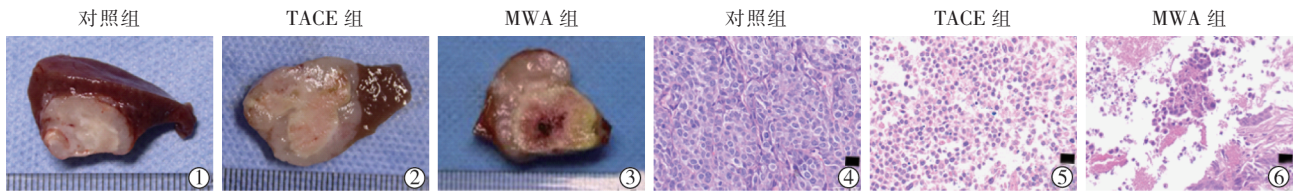
## 2.2 VX2 兔肝癌标本大体病理和 HE 染色

大体病理: 对照组肿瘤组织活性较好, 中心少量

坏死(图 2①); TACE 组肿瘤组织内可见大量坏死, 呈白灰色(图 2②); MWA 组也可见大片状坏死, 坏死边缘呈灰白色或淡黄色, 中央呈浅红色(图 2③)。HE 染色: 3 组均显示肿瘤细胞排列紊乱。对照组肿瘤细胞结构致密呈腺管样或条索状, 细胞体积大, 核大而深染(图 2④); TACE 组肿瘤细胞核固缩, 胞质染色呈浅粉色(图 2⑤); MWA 组肿瘤细胞大量坏死, 坏死肿瘤细胞形状异常, 细胞结构不完整, 核深染, 可见核碎裂、核溶解(图 2⑥)。

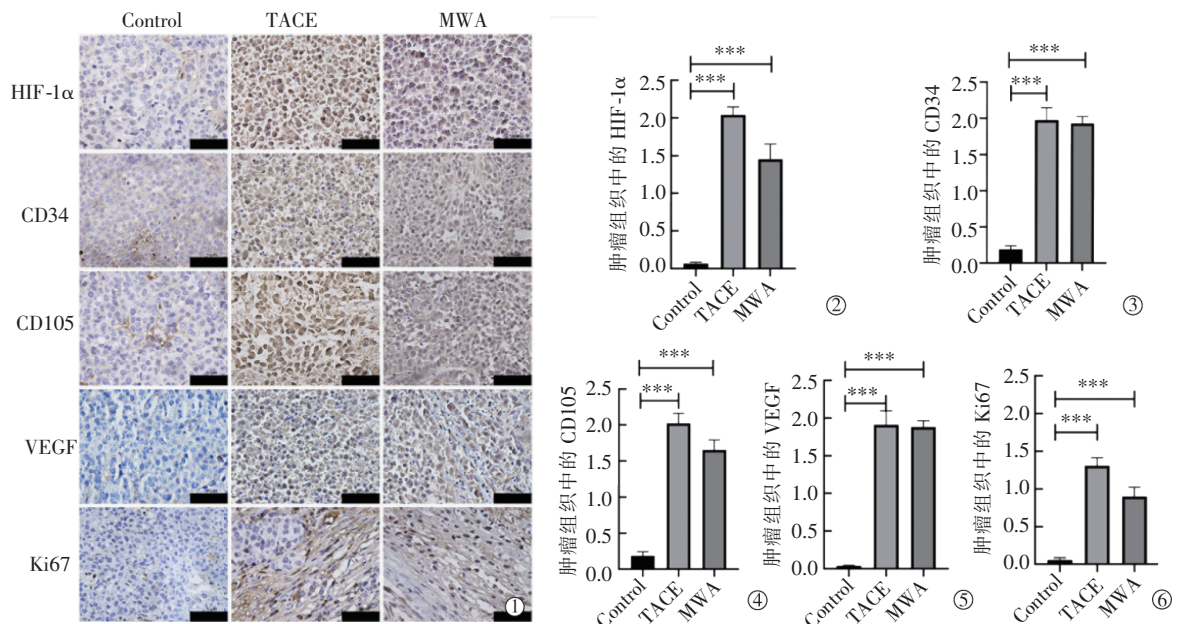
## 2.3 肝癌组织免疫组化检测

免疫组化检测后 3 组镜下肿瘤细胞形态变化见图 3①。检测结果显示, 肝癌组织中可促进 VEGF 转录激活及肿瘤血管新生的 HIF-1 $\alpha$  呈现弥漫性表达, 细胞质为棕褐色, TACE 组、MWA 组与对照组相比 HIF-1 $\alpha$  表达显著上调(图 3②)(均  $P<0.01$ ); 血管新生标记物 CD34、CD105 及 VEGF 弥漫分布于肿瘤细胞质, 呈棕黄色或棕褐色, TACE 组、MWA 组与对照组相比 CD34、CD105 及 VEGF 表达显著上



①②③肿瘤大体照像; ④⑤⑥肿瘤细胞 HE 染色图像(标尺 20  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ )

图 2 3 组兔 VX2 肝癌组织大体解剖照像和 HE 染色图像



\*\*\* $P<0.001$

①各镜下肿瘤细胞形态变化(标尺 50  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ); ②③④⑤⑥分别为各组肝癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、CD34、CD105、VEGF、Ki67 表达量柱状图

图 3 3 组免疫组化检测结果

调(图 3③④⑤)(均  $P < 0.01$ );表示肿瘤增殖情况的 Ki67 主要分布于细胞核,呈棕褐色,TACE 组、MWA 组 Ki67 表达显著高于对照组(图 3⑥)(均  $P < 0.01$ )。

#### 2.4 术后糖酵解相关蛋白表达

3 组术后糖酵解关键蛋白 GLUT1、GLUT4、HK2、PKM2、PDK1、LDHA 免疫印迹电泳图见图 4①。与对照组相比,TACE 组、MWA 组术后 GLUT1、GLUT4 表达升高(均  $P < 0.05$ )(图 4②③);MWA 组术后 PKM2、HK2 表达升高( $P < 0.05$ ),但 TACE 组的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 4④⑤);TACE 组术后 LDHA、PDK1 表达升高( $P < 0.05$ ),但 MWA 组的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 4⑥⑦)。

#### 2.5 Pearson 相关性分析

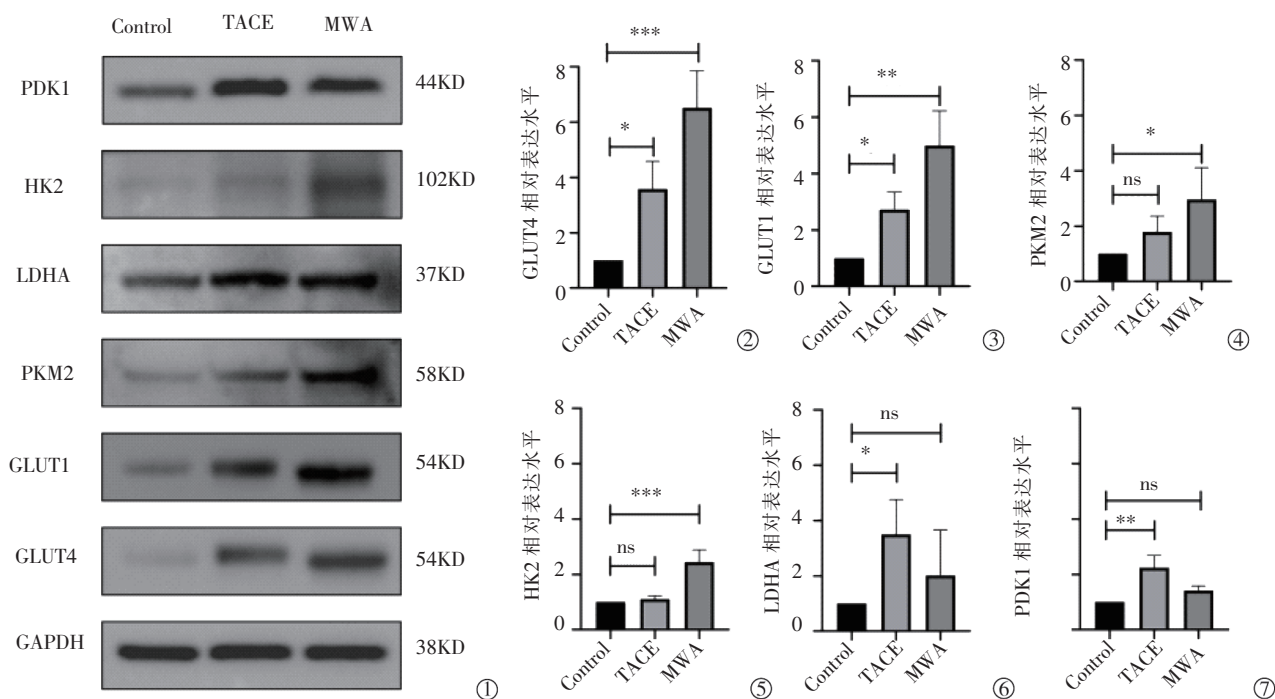
Pearson 相关性分析结果显示,CD34 与 GLUT1 ( $r=0.77, P=0.000\ 2$ )、GLUT4 ( $r=0.81, P<0.000\ 1$ )、HK2 ( $r=0.50, P=0.03$ )、LDHA ( $r=0.65, P=0.003$ )、PDK1 ( $r=0.60, P=0.008$ )、PKM2 ( $r=0.66, P=0.003$ )呈正相关;CD105 与 GLUT1 ( $r=0.68, P=0.002$ )、GLUT4 ( $r=0.70, P=0.001$ )、LDHA ( $r=0.78, P=0.000\ 1$ )、PDK1 ( $r=0.76, P=0.003$ )、PKM2 ( $r=0.55, P=0.02$ )呈正相关,但与 HK2 差异无统计学意义( $P > 0.05$ );VEGF 与 GLUT1 ( $r=0.76, P=0.000\ 3$ )、GLUT4 ( $r=0.78, P=0.000\ 1$ )、HK2 ( $r=0.49, P=0.04$ )、LDHA ( $r=0.72, P=0.000\ 7$ )、PDK1 ( $r=0.66, P=0.003$ )、PKM2 ( $r=0.63, P=0.005$ )呈正相关,见图5。

### 3 讨论

本研究基于 VX2 肝癌移植瘤模型探索 TACE 和 MWA 术后糖酵解代谢及微血管密度变化,结果提示 TACE 和 MWA 术后微血管密度增多,糖酵解代谢相关蛋白表达上调,且微血管密度与糖酵解相关蛋白表达呈正相关;为此推测,这可能与 HIF-1 $\alpha$  表达上调有关。

肝动脉为 HCC 主要供血来源,约占 90%,是 TACE 治疗 HCC 理论依据。TACE 为不可切除 HCC 患者重要治疗方案<sup>[10]</sup>。阻断供血动脉后肿瘤缺氧加重,导致 HIF-1 $\alpha$  表达上调<sup>[11]</sup>。TACE 诱导 VEGF 和 CD34 表达,促进肿瘤内血管新生<sup>[12]</sup>。MWA 最大问题在于不能使肿瘤组织完全坏死,残余肿瘤组织中 HIF-1 $\alpha$  表达增加。HIF-1 $\alpha$  诱导包括 VEGF、CD34、CD105 在内促血管生成因子表达,促进 HCC 瘤体血管生成<sup>[13-14]</sup>,从而有利于肿瘤生长。本研究免疫组化检测结果显示,TACE、MWA 术后 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CD34、CD105 表达较对照组显著增加,与既往研究相符。

Yasuda 等<sup>[15]</sup>研究发现,HIF-1 $\alpha$  参与肿瘤能量代谢,通过转录激活糖酵解相关靶基因诱导代谢重编程加速糖酵解代谢,是 HCC 在缺氧环境下主要能量来源。Warburg 等首次在大鼠肝癌中发现有氧糖酵解是肝癌生长特征之一,因此被称为“Warburg



<sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$

①免疫印迹电泳图;②GLUT4 蛋白表达;③GLUT1 蛋白表达;④PKM2 蛋白表达;⑤HK2 蛋白表达;⑥LDHA 蛋白表达;⑦PDK1 蛋白表达

图 4 3 组术后糖酵解相关蛋白表达

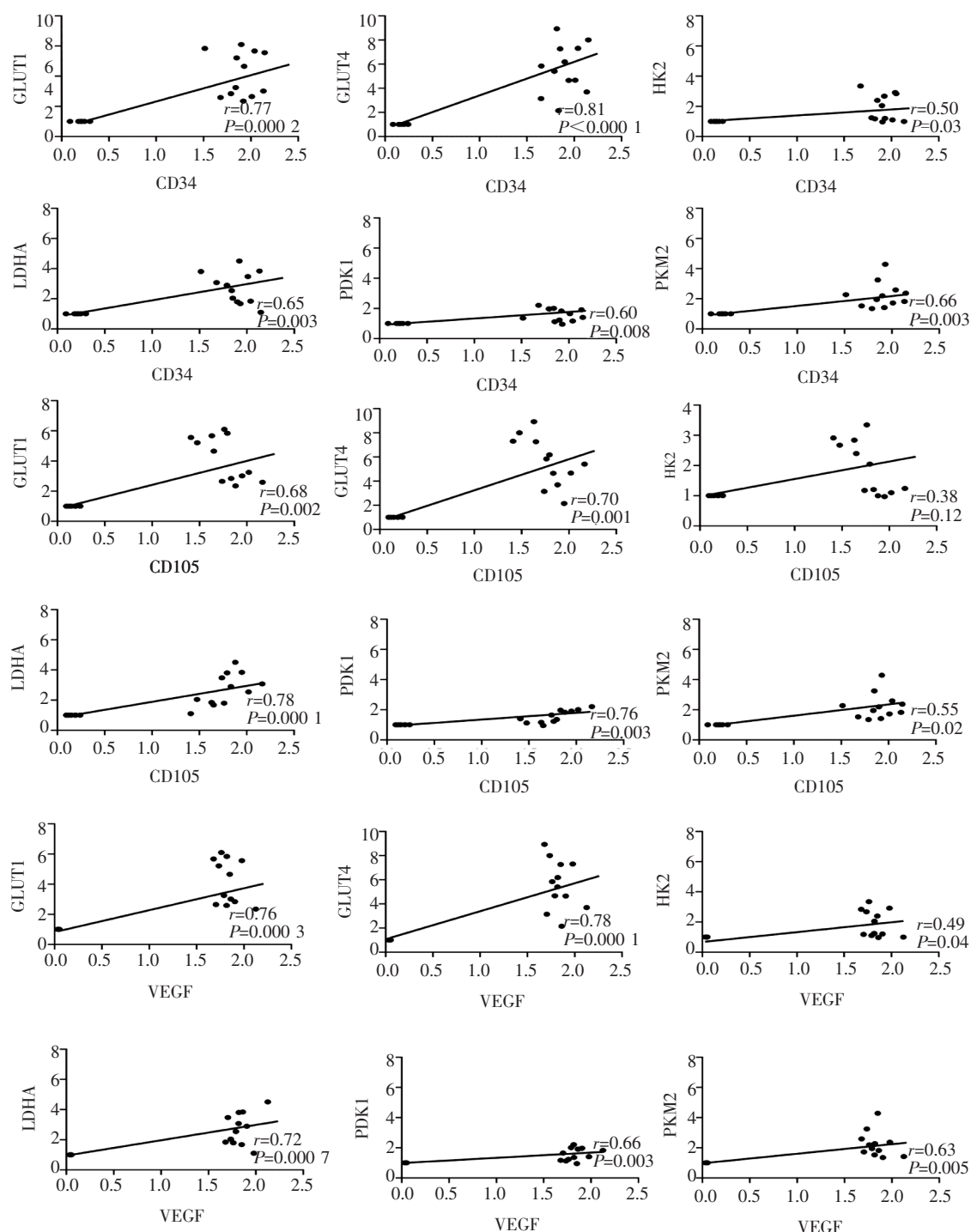


图 5 CD34、CD105、VEGF 与 GLUT1、GLUT4、HK2、LDHA、PDK1、PKM2 间相关性散点图

效应”<sup>[16]</sup>，肝癌细胞即使在足够氧气存在条件下也倾向于将葡萄糖和丙酮酸转化为乳酸，而不是将丙酮酸转移至线粒体中用于氧化磷酸化。HCC 患者糖酵解关键酶 GLUT1、HK2 及 PKM2 高表达，其较差的总生存率与这些关键酶密切相关<sup>[17]</sup>。研究发现，沉默的 HK2 在人 HCC 细胞中能抑制肿瘤细胞生长，并与索拉非尼协同发挥抗肿瘤作用<sup>[18]</sup>。因此，这些在肝癌组织异常表达的糖酵解关键酶可能成为

HCC 患者潜在治疗靶点。本研究蛋白印迹实验结果显示 TACE、MWA 术后糖酵解关键酶有不同程度升高，提示糖酵解代谢上调，这可能与 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CD34、CD105 表达增加有关。

肝癌中糖酵解与微血管密度关系的研究报道较少。有研究表明，肿瘤周细胞中由 HK2 驱动的糖酵解升高，可通过 ROCK2-MLC2 使血管收缩，抑制糖酵解可使肿瘤周细胞血管正常化，提高肿瘤局部



药物浓度,从而抑制肿瘤生长<sup>[19]</sup>。有研究表明在其他疾病研究中,内皮细胞糖酵解在血管生成调控中起关键作用,缺氧上调糖酵解途径中磷酸果糖激酶-2 表达,促进了人脑微血管内皮细胞体外血管生成<sup>[20]</sup>。此外,敲除的内皮细胞中 Sirtuin 3 蛋白会下调糖酵解酶磷酸果糖激酶-3 表达,抑制内皮糖酵解代谢和血管生成<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,TACE 和 MWA 术后糖酵解关键酶 GLUT1、GLUT4、HK2、PKM2、LDHA、PDK1 均较对照组显著升高,微血管密度标志物 CD105、CD34、VEGF 均较对照组显著升高;Pearson 相关性分析评价表明,微血管密度与糖酵解相关蛋白呈正相关。

本研究局限性在于样本量较小,研究设计尚不够全面,对 TACE 和 MWA 术后糖酵解与微血管间机制研究不够深入透彻。今后研究将通过分析糖酵解关键酶基因敲除、聚合酶链式反应、酶联免疫吸附试验等方法进一步验证 TACE 和 MWA 术后糖酵解与微血管的关系。

综上所述,TACE 和 MWA 术后微血管密度增多及糖酵解代谢相关蛋白表达上调,且糖酵解相关蛋白表达与微血管密度呈正相关,为临床肝癌患者治疗及监测预后提供了新思路。

#### [参 考 文 献]

- [1] Zhang CH, Cheng Y, Zhang S, et al. Changing epidemiology of hepatocellular carcinoma in Asia[J]. *Liver Int*, 2022, 42: 2029-2041.
- [2] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7: 6.
- [3] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2022, 400: 1345-1362.
- [4] Xue J, Ni H, Wang F, et al. Advances in locoregional therapy for hepatocellular carcinoma combined with immunotherapy and targeted therapy[J]. *J Interv Med*, 2021, 4: 105-113.
- [5] Wang Z, Liu M, Zhang DZ, et al. Microwave ablation versus laparoscopic resection as first-line therapy for solitary 3-5-cm HCC[J]. *Hepatology*, 2022, 76: 66-77.
- [6] Duan X, Chen P, Han X, et al. Publisher correction: the influence of liposomal quercetin on liver damage induced by microwave ablation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 16063.
- [7] Li H, Chen P, Wang M, et al. Liposome quercetin enhances the ablation effects of microwave ablation in treating the rabbit VX2 liver tumor model[J]. *Int J Hyperthermia*, 2022, 39: 162-172.
- [8] 贾中芝,冯耀良,施海彬. 原发性肝癌 TACE 前后血清 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 的相关性[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2010, 7:117-120.
- [9] Cheng Z, Zhang S, Wang L, et al. Ultrasound-guided percutaneous implantation of rabbit VX2 carcinoma, using a coaxial technique and gelfoam pellet injection combination to establish a rabbit liver tumor model[J]. *Diagn Interv Radiol*, 2022, 28: 103-107.
- [10] Chen L, Yu CX, Zhong BY, et al. Development of TACE refractoriness scores in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 615133.
- [11] Xu W, Kwon JH, Moon YH, et al. Influence of preoperative transcatheter arterial chemoembolization on gene expression in the HIF-1 $\alpha$  pathway in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140: 1507-1515.
- [12] 沈海洋,刘瑞宝,刘 岩,等. 肝右叶前、后段原发性肝癌 TACE 后 VEGF 及 CD34 的表达水平[J]. *介入放射学杂志*, 2012, 21:469-472.
- [13] Xiong XX, Qiu XY, Hu DX, et al. Advances in hypoxia-mediated mechanisms in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 92: 246-255.
- [14] Morse MA, Sun W, Kim R, et al. The role of angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25: 912-920.
- [15] Yasuda S, Arii S, Mori A, et al. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and its significance[J]. *J Hepatol*, 2004, 40: 117-123.
- [16] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 325-337.
- [17] Du D, Liu C, Qin M, et al. Metabolic dysregulation and emerging therapeutic targets for hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 558-580.
- [18] DeWaal D, Nogueira V, Terry AR, et al. Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin[J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 446.
- [19] Meng YM, Jiang X, Zhao X, et al. Hexokinase 2-driven glycolysis in pericytes activates their contractility leading to tumor blood vessel abnormalities[J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 6011.
- [20] 李玉茹. 磷酸果糖激酶-2(PFKFBs)参与脑微血管生成的机制研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2021.
- [21] He X, Zeng H, Chen ST, et al. Endothelial specific SIRT3 deletion impairs glycolysis and angiogenesis and causes diastolic dysfunction[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 112: 104-113.

(收稿日期:2023-08-17)

(本文编辑:谷 珂)