

# The Expression of Inflammatory Cytokines in Liver Cirrhosis Rats Serum under the Condition of the Whole Liver Blood Flow Blocking

Xingyun Wang<sup>1</sup>, Kewei Meng<sup>2</sup>, Feilong Huang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Yantai Institute of Medical Science and Technology, Yantai Shandong

<sup>2</sup>Hospital of Yuhuangding, Yantai Shandong

Email: ykswxy@126.com

Received: Sep. 21<sup>st</sup>, 2016; accepted: Oct. 5<sup>th</sup>, 2016; published: Oct. 10<sup>th</sup>, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

**Objective:** To research the expression of inflammatory cytokines which easily lead to multiple organ damage in liver cirrhosis rats serum under the condition of the whole liver blood flow blocking. **Methods:** Eight male SD rats weight 160 - 200 g were selected. The liver cirrhosis rats model was established by 30% CCl<sub>4</sub> solution to fill the stomach and 5% alcohol to feed. Eighty SD rats were randomly divided into four groups, with 20 rats in each group. By blocking porta hepatis, liver up and inferior vena cava for 15 min (A2 group), 30 min (A3 group), 45 min (A4 group) production of cirrhosis rats whole liver blood flow blocking model, and the sham operation group (A1 group) as control. Twenty rats in each group were sacrificed at 15, 30, 45 min, respectively after modeling. According to the blocking time, they were killed lively, to monitor the expression of TNF- $\alpha$ , NF-KB and IL-21 in the serum from the inferior vena cava. All data were analyzed by using the analysis of variance or t test. **Results:** Cirrhosis rats whole liver blood flow blocking model compared with those in group A1, levels of TNF- $\alpha$ , NF-KB and IL-21 were significantly increased ( $p < 0.05$ ), and the expression of inflammatory cytokines trend to grow by time. **Conclusion:** The expression of inflammatory cytokines which easily lead to multiple organ damage in liver cirrhosis rats serum under the condition of the whole liver blood flow blocking was increased. The concentration of inflammatory cytokines increases with the extension of blocking time. There is a mutual influence among different inflammatory cytokines which play a role in the injury of organ function.

## Keywords

Liver Cirrhosis, Whole Liver Blood Flow Blocking, Inflammatory Cytokines, Rat

# 肝硬化大鼠全肝血流阻断对血清相关炎性因子表达的影响

王兴运<sup>1</sup>, 孟珂伟<sup>2</sup>, 黄飞龙<sup>2</sup>

<sup>1</sup>烟台市医学科学技术研究所, 山东 烟台

<sup>2</sup>烟台毓璜顶医院, 山东 烟台

Email: ykswxy@126.com

收稿日期: 2016年9月21日; 录用日期: 2016年10月5日; 发布日期: 2016年10月10日

## 摘要

目的: 研究肝硬化大鼠全肝血流阻断后血清中易导致多器官功能损伤的相关炎性因子表达的情况。方法: 选用雄性SD大鼠80只, 体重160~200 g, 30%CCl<sub>4</sub>油溶液灌胃及饮用5%乙醇水制成肝硬化模型, 随机分4组, 每组20只。采用阻断肝门、肝上上腔静脉及肝下下腔静脉15 min (A2组)、30 min (A3组)、45 min (A4组)制作肝硬化大鼠全肝血流阻断模型, 并以假手术组(A1组)作为对照。按阻断时间活杀取材, 采用肝下下腔静脉取血, 监测血清中TNF- $\alpha$ 、NF-KB及IL-21的表达。多个样本均数比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用t检验。结果: 全肝血流阻断各组与A1组相比血清中TNF- $\alpha$ , NF-KB, IL-21浓度明显升高( $P < 0.05$ ), 且随时间增加, 表达呈逐渐增强趋势。结论: 肝硬化大鼠全肝血流阻断后, 血清中相关炎性因子的表达浓度是升高的, 随阻断时间的延长, 因子的浓度呈上升趋势, 而不同炎性因子之间存在影响, 在器官功能损伤中发挥作用。

## 关键词

肝硬化, 全肝血流阻断, 炎性因子, 大鼠

## 1. 引言

我国是肝硬化及原发性肝癌的高发国家, 病例超过全球半数。针对原发性肝癌的治疗, 近年来虽然随着介入治疗、生物治疗、分子靶向治疗等方法的相继出现, 但手术治疗依然是目前治疗肝癌的首选方式[1]。而对于终末期肝硬化病人, 肝移植手术是其治疗的最根本方法。但肝脏手术大多操作复杂、技术难度大、出血多, 必要时需要全肝血流阻断, 而阻断血流后常常造成全身多脏器继发损伤, 如胃肠道损伤、肺损伤、肾脏损伤等。而往往多器官继发损伤是患者术后尽早康复的主要障碍之一, 甚至成为病人死亡的主要原因之一。随着分子生物学的发展与研究, 在器官功能损伤中, 炎性因子扮演着不可或缺的角色已得到证实[2]。本研究采用肝硬化模型大鼠, 通过采用阻断肝门、肝上上腔静脉及肝下下腔静脉 15 min (A2组)、30 min (A3组)、45 min (A4组)制作肝硬化大鼠全肝血流阻断模型, 并以假手术组(A1组)

作为对照。按阻断时间活杀取材,采用肝下下腔静脉取血,监测血清中 TNF- $\alpha$ 、NF-KB 及 IL-21 的表达,从而在分子生物学水平上,对全肝血流阻断后易导致全身多器官功能继发损伤的机制进行初步探讨。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 实验动物及主要试剂

选用雄性 SD 大鼠 80 只,体重 160~200 g,由山东绿叶制药公司实验动物中心提供。TNF- $\alpha$ 、NF-KB 及 IL-21ELISA 试剂盒购自美国 GBD 公司。

### 2.2. 实验方法

#### 2.2.1. 实验动物分组

将 80 只健康成年雄性 SD 大鼠随机分 4 组(A1、A2、A3、A4),每组 20 只,给予 30%CCl<sub>4</sub> 油溶液灌胃及饮用 5%乙醇水制成肝硬化模型,喂养普通大鼠饲料。动物成模后:对照组:仅游离第一肝门、肝上下腔静脉、肝下下腔静脉组(A1)。实验组随机分 4 组,每组 20 只:即行第一肝门、肝上下腔静脉、肝下下腔静脉阻断 15 分钟组(A2 组)、30 分钟组(A3 组)、45 分钟组(A4 组)。动物成模后按阻断时间活杀取材,检测有关指标。

#### 2.2.2. 大鼠肝硬化全肝血流阻断模型的制备

按照大鼠肝硬化模型传统制作方法,给予大鼠 30%CCl<sub>4</sub> 油溶液灌胃,以 5%乙醇水为唯一饮用水,并以普通大鼠饲料喂养 10 周,制成大鼠肝硬化模型。大鼠肝硬化模型成模后随机分为 4 组:麻醉后,固定大鼠于手术台上,采用上腹正中切口进入腹腔,仔细分离显露肝门、肝下下腔静脉及肝上上腔静脉,并采用无损伤血管钳钳夹阻断,建立肝硬化大鼠全肝血流阻断模型。

#### 2.2.3. 检测指标及方法

1) 各组大鼠根据不同手术阻断时间处死,取部分肝组织置于 10%多聚甲醛溶液中固定备 HE 染色病理检查。

2) 于肝下下腔静脉采血 1 ml,4000 r/min\*10 min 离心,取上清液,-80℃冻存。以备采用酶联免疫吸附试剂盒双抗体夹心 ABC-ELISA 法测血清中 TNF- $\alpha$ 、NF-KB、IL-21 的含量。

3) 血清中 TNF- $\alpha$ 、NF-KB、IL-21 含量测定:采用酶联免疫吸附试剂盒双抗体夹 ABC-ELISA 法检测。严格按试剂说明书(GBD 公司提供)进行定量测定。

#### 2.2.4. 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计分析软件对各组数据进行统计学分析。实验所得数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料采用单因素方差分析,等级资料采用秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. 大鼠肝硬化病理变化

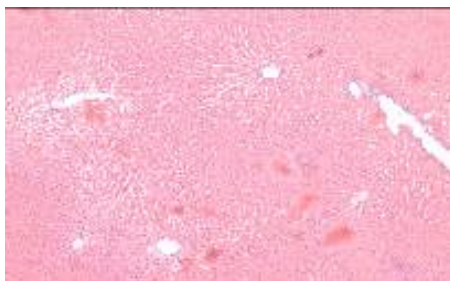
正常肝脏大小适中、色红、质软,肝脏变小、色灰红、质硬,肝表面见肝硬化结节,部分大鼠腹腔内可见腹水。镜下可见纤维组织增生,肝细胞结节状再生和假小叶形成。结节内肝细胞部分变性,灶性坏死,并可见少许双核肝细胞。肝窦内见淤血,纤维间隔增宽,并可见较多炎细胞浸润,间隔内血管扩张、充血。见图 1~4。



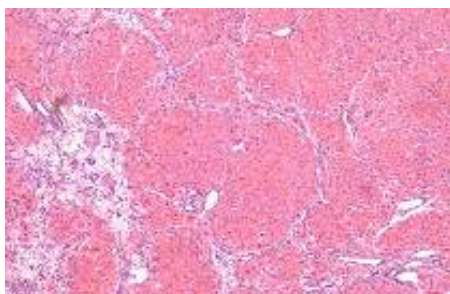
**Figure 1.** The liver cirrhosis rats model  
**图 1.** 肝硬化大鼠模型



**Figure 2.** The live cirrhosis rats model  
**图 2.** 肝硬化大鼠模型



**Figure 3.** The live pathological changes of cirrhosis rats  
**图 3.** 肝硬化大鼠肝脏病理表现



**Figure 4.** The live pathological changes of cirrhosis rats  
**图 4.** 肝硬化大鼠肝脏病理表现

### 3.2. 血清 TNF- $\alpha$ 、NF-KB、IL-21 的变化

肝硬化大鼠全肝血流阻断后 TNF- $\alpha$ 、NF-KB、IL-21 在血清中的表达均有升高, 其浓度的升高与血流阻断时间呈正相关性, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

## 4. 讨论

我国乙型肝炎病毒(HBV)感染率极高, 近年来丙型肝炎病毒(HCV)的感染率也有上升的趋势, 感染 HBV 及 HCV 的患者的肝脏易逐渐发展肝硬化, 而在此基础上并发原发性肝癌、终末期肝硬化的患者多需要手术治疗, 尤其是终末期需行肝移植手术。肝血流阻断已成为目前肝脏手术普遍应用的方法, 而对于肝移植及在肝肿瘤切除过程中遇到难以控制的出血时, 需要行全肝血流阻断。全肝血流阻断后导致全身血流动力学发生巨大变化, 此时肠道静脉回流受阻, 肠粘膜处于淤血、缺血状态, 而肠道是最易发生缺血、缺氧受损的器官之一, 有相关学者认为[3], 肠道不仅是多器官功能障碍综合症(MODS)的靶器官, 更是 MODS 中的启动者。随着全肝血流阻断时间的延长, 肠道黏膜缺血、缺氧严重, 黏膜水肿通透性增加, 诱发肠道内细菌及内毒素移位, 引起肠道的炎症反应, 出现全身炎症反应综合症的临床表现。同时由于腔静脉和门静脉肝动脉阻断后, 使约占 50%~60%的下腔静脉的血流不能回流入心脏, 使肺脏、肾脏等器官处于相对缺血状态, 血流阻断开放后, 氧自由基和能量代谢障碍会进一步加重形成再灌注损伤[4], 并激活全身炎性反应, 大量的炎性介质释放入血液, 激活中性粒细胞致肺泡基底膜、肺间质、肾小球损伤, 影响肺及肾脏功能。大量炎性介质释放入血液中, 在继发多器官功能损伤的发生、发展和转归中起着重要的作用[5]。

肿瘤坏死因子在粒细胞激活过程中起重要的调节作用, 肿瘤坏死因子在炎症反应和免疫作用中也起着关键性的作用, 肿瘤坏死因子在此过程的初级阶段分泌出来, TNF- $\alpha$  可由细菌脂多糖激活单核-巨噬细胞产生, 引起肿瘤组织出血坏死, 其不但可以自身激活, 还可以促进其他炎性介质的产生和释放, 引起级联放大反应, 形成瀑布样效应, 诱发和加重全身炎症反应综合症, 参与了多种疾病的病理过程, 且相关研究表明其与气道炎性反应程度密切相关[6]。本实验结果显示: A1 组大鼠肝下腔静脉血中的 TNF- $\alpha$  呈现低表达, 而全肝血流阻断的各组血清中的 TNF- $\alpha$  明显高于 A1 组, 且随时间增加, TNF- $\alpha$  表达逐渐增强。

核转录因子 KB 是一种具有基因转录多项调控作用的转录因子, 几乎存在所有细胞中。Baltimore D [7] 于 1986 从 B 淋巴细胞细胞核提取物里发现, 并命名为核因子-KB, 即 NF-KB。此因子可与免疫球蛋白 K 链基因增强子 KB 序列特异性结合, 并同时能够促使 K 基因表达的核蛋白因子。伴随 NF-KB 的出现, 科研人员开始研究它的生物学功能。目前相关研究已发现 NF-KB 能调控表达表达众多因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1、

**Table 1.** Values of serum TNF- $\alpha$ 、NF-KB、IL-21 in rats

**表 1.** 各组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、NF-KB、IL-21 变化( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	TNF- $\alpha$ 浓度(ng/L)	NF-KB浓度(pg/mL)	IL-21浓(pg/mL)
A1	20	15.63 $\pm$ 2.32	11.52 $\pm$ 2.32	628.30 $\pm$ 12.76
A2	20	20.76 $\pm$ 3.41 <sup>#</sup>	14.47 $\pm$ 2.25 <sup>#</sup>	707.67 $\pm$ 22.03 <sup>#</sup>
A3	20	20.43 $\pm$ 3.52 <sup>#</sup>	15.13 $\pm$ 2.45 <sup>#</sup>	703.59 $\pm$ 19.20 <sup>#</sup>
A4	20	33.31 $\pm$ 3.71 <sup>*</sup>	17.98 $\pm$ 1.51 <sup>*</sup>	796.96 $\pm$ 13.46 <sup>*</sup>

注(note): A1 为假手术对照组(A1the sham operation group); A2 为阻断 15 min 组(A2 blocking porta hepatis, liver up and inferior vena cava for 15 min); A3 为阻断 30 min 组(A3 blocking porta hepatis, liver up and inferior vena cava for 30 min); A4 为阻断 45min 组(A4 blocking porta hepatis, liver up and inferior vena cava for 45 min); 与假手术组比较(compared with A1), <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与 A3 组比较(compared with A3), <sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

IL-6 等)、黏附分子、趋化因子、急性反应蛋白、生长因子等等[8]。有相关研究证实通过抑制 NF- $\kappa$ B 的表达,进而抑制炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  的释放,能够起到保护器官组织的作用[9],白细胞介素 21 (IL-21) 是 2000 年发现的属于 IL-2 细胞因子家族,它主要有活化的 CD4T 细胞分泌产生,因其受体表达于多种免疫细胞(B 细胞、T 细胞、NK 细胞),所以它在免疫系统中的发挥着重要的调节作用[10]。而在炎症反应、自身免疫性疾病中,IL-21、TGF- $\beta$  等促炎症细胞因子的过度表达通过影响初始 T 细胞的分化格局,增加 TH17 细胞分化,破坏 Treg/TH17 平衡,导致一系列炎症反应损伤机体[11]。本实验结果显示:与 A1 组血清中 NF- $\kappa$ B, IL-21 浓度相比,全肝血流阻断组 NF- $\kappa$ B, IL-21 浓度明显升高,且随时间增加, NF- $\kappa$ B, IL-21 表达逐渐增强,而与之相对应时间段血清中 TNF- $\alpha$  的浓度也随之升高。证实了 TNF- $\alpha$  浓度的升高与 NF- $\kappa$ B、IL-21 浓度升高呈正相关性。

综上所述,全肝血流阻断后,血清中能够诱发术后多器官功能继发损伤的相关炎症因子的表达浓度是升高的,且随阻断时间的延长,因子的浓度呈上升趋势,而不同炎症因子之间存在影响,在器官功能损伤中发挥作用。

## 基金项目

2009~2014 烟台市科技发展计划“Fractalkine 在肝硬化全肝血流阻断致肺损机制中的表达及意义”。

## 参考文献 (References)

- [1] 李坚,张德阳,刘恕,李年丰,李浩. 选择性半肝血流阻断在肝癌半肝切除术中的应用研究[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(15): 2331-2333.
- [2] 陈德昌. 多器官功能障碍综合症基本概念的演变过程与发病机制探讨[M]. 黄家驷外科学第 6 版, 北京: 人民卫生出版社, 2002: 400-406.
- [3] Sheng, P.P. and Mao, R.S. (2009) The Significance of Monitoring Intra-Abdominal Pressure in Critically Ill Patients. *Clin Educ Gen Pract*, **7**, 114.
- [4] Biais, M., Nouette-Gaulain, K., Quinart, A., et al. (2009) Uncalibrated Stroke Volume Variations Are Able to Predict the Hemodynamic Effects of Positive End-Expiratory Pressure in Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome after Liver Transplantation. *Anesthesiology*, **111**, 855-862. <http://dx.doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181b27fb2>
- [5] Neunaber, C., Zeckey, C., Andruszkow, H., et al. (2011) Immunomodulation in Polytrauma and Polymicrobial Sepsis—Where Do We Stand? *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, **5**, 17-25. <http://dx.doi.org/10.2174/187221311794474892>
- [6] 刘慧芳,李风森,杜丽娟. AECOPD 病情严重程度与痰中 IL-8、TNF- $\alpha$  水平的关系研究[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(9): 1122.
- [7] Baltimore, D. (1986) Inducibility of Kappa Immunoglobulin Enhancer-Binding Protein NF-Kappa B by a Posttranslational Mechanism. *Cell*, **47**, 921-928. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90807-X](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(86)90807-X)
- [8] 金晶,刘耕陶. NF- $\kappa$ B 的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2000, 27(3): 133-137.
- [9] 张鹏. 慢性胰腺炎大鼠肝组织 NF- $\kappa$ B 的表达及中药的干预作用[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2008, 24(5): 490-493.
- [10] Spolski, R. and Leonard, W.J. (2008) Interleukin-21: Basic Biology and Implications for Cancer Autoimmunity. *Annual Review of Immunology*, **26**, 57-79. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090316>
- [11] Xie, J.J., Wang, J., Tang, T.T., et al. (2010) Th17/Treg Functional Imbalance during Atherogenesis in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *Cytokine*, **49**, 185-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2009.09.007>

**期刊投稿者将享受如下服务：**

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[hjs@hanspub.org](mailto:hjs@hanspub.org)