

核因子 κ B和白细胞介素-6在放射性膀胱损伤中的表达及意义

阮绥鑫¹, 李良², 陈静³

(锦州医科大学 1. 附属第一医院妇科, 辽宁 锦州 121000; 2. 附属第三医院泌尿科, 辽宁 锦州 121000; 3. 附属第一医院日间化疗中心, 辽宁 锦州 121000)

摘要 **目的** 检测核因子 κ B (NF- κ B) 和白细胞介素-6 (IL-6) 在放射性膀胱损伤中的表达特征及其相关性。**方法** 选择人输尿管上皮永生细胞SV-HUC-1进行培养, 分别应用5、10和15 Gy的X线照射24、48和72 h, 将未行照射的SV-HUC-1细胞作为正常对照组。CCK-8检测细胞增殖活性, 实时定量PCR检测NF- κ B和IL-6 mRNA的表达。将siRNA-NF- κ B质粒转染至15 Gy X线照射72 h后的细胞株建立siRNA-NF- κ B组 (si-NF- κ B组), 将未转染质粒的15 Gy X线照射72 h后细胞株作为空白对照组, Western blotting检测IL-6蛋白的表达。将20只雄性SD大鼠分为模型组 (一次性给予20 Gy X线照射, 建立放射性膀胱损伤大鼠模型) 和对照组 (不给予照射), 每组10只, 2周后处死大鼠, 实时定量PCR检测膀胱组织中NF- κ B和IL-6 mRNA的表达。**结果** SV-HUC-1细胞中, 细胞增殖活性随着照射剂量和照射时间的增加而降低, NF- κ B和IL-6 mRNA的表达随着照射剂量和照射时间的增加而增加。si-NF- κ B组中IL-6的表达量明显低于空白对照组 ($P < 0.05$)。放射性膀胱损伤大鼠模型的膀胱病变组织中, NF- κ B和IL-6 mRNA的表达明显高于对照组 ($P < 0.05$), NF- κ B和IL-6 mRNA的表达呈正相关。**结论** X线对膀胱的损伤呈浓度和时间依赖性, 病变组织中NF- κ B和IL-6的表达升高, 二者具有协同作用。

关键词 放射性膀胱损伤; 核因子 κ B; 白细胞介素-6; 炎症病变

中图分类号 R69 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)04-0332-05

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240408.1011.030>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.04.007

Expression and significance of nuclear factor- κ B and interleukin-6 in radiation-induced bladder injury

RUAN Suixin¹, LI Liang², CHEN Jing³

(1. Department of Gynecology, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 2. Department of Urology, The Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 3. Day Chemotherapy Center, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract **Objective** To detect the expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and interleukin-6 (IL-6) in radiation-induced bladder injury and analyze their relationship. **Methods** SV-HUC-1 cells were cultured and irradiated with X-ray doses of 5, 10, and 15 Gy for 24, 48, and 72 h, respectively, and those not irradiated were used as a normal control group. Proliferative activity of SV-HUC-1 cells was detected using a CCK-8 assay, and the expression of NF- κ B and IL-6 mRNA was detected by real-time quantitative PCR. An siRNA-NF- κ B plasmid was transfected into SV-HUC-1 cells following irradiation with 15 Gy for 72 h to establish the si-NF- κ B group, and cells not transfected following irradiation with 15 Gy for 72 h was used as a blank control group. Expression of IL-6 protein was detected by Western blotting. Twenty male SD rats were divided into a model group (receiving 20 Gy irradiation to establish a model of radiation-induced bladder injury) and control group ($n = 10$ per group). The expression of NF- κ B and IL-6 mRNA in the rat urinary bladder tissues was detected by real-time quantitative PCR. **Results** With an increase in irradiation dose and time, the proliferative activity of SV-HUC-1 cells decreased, and the expression of NF- κ B and IL-6 mRNA increased. The expression of IL-6 was significantly lower in the si-NF- κ B group than in blank control group. The expression of NF- κ B and IL-6 mRNA in the rat urinary bladder tissues was higher in the model group than in control group, and a positive correlation was observed between the expression of NF- κ B and IL-6 mRNA. **Conclusion** Damage caused by X-rays to the urinary bladder is concentration- and time-dependent. High expression and synergistic effect of NF- κ B and IL-6 lead to the formation of radiation-induced bladder injury.

Keywords radiation-induced bladder injury; nuclear factor- κ B; interleukin-6; inflammatory lesion

基金项目: 中国医疗手牵手工程委员会北京医学奖励基金会 (YXTL-2021-1092-0640)

作者简介: 阮绥鑫 (1992-), 女, 主管护师, 本科。

通信作者: 陈静, E-mail: 584860042@qq.com

收稿日期: 2023-05-16

网络出版时间: 2024-04-10 18:00:32

放射性膀胱损伤是腹腔、盆腔恶性肿瘤患者接受放射治疗后的常见并发症,以早期的膀胱炎症和后期的膀胱出血、纤维化为主要特征。目前,仍缺乏针对放射性膀胱损伤的有效治疗手段。近年来,研究^[1]发现多种细胞因子参与放射性膀胱损伤病变的形成和进展。核因子κB(nuclear factor-κB, NF-κB)是近年关注的与细胞增殖、损伤和炎症反应形成相关的因子,不仅在肿瘤性增生中发挥重要作用,在放射性损伤及继发的炎症损伤中的作用也较明显^[2]。白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)是促炎性细胞因子和免疫介导因子,参与炎症反应形成中的瀑布效应。研究^[3]显示, NF-κB与IL-6可能具有协同作用。本研究通过观察放射性膀胱损伤的病变特征,分析NF-κB与IL-6的关系,为研究放射性膀胱损伤的形成机制和防治提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人输尿管上皮永生化细胞SV-HUC-1,购于中国科学院上海细胞库。雄性成年SD大鼠20只,体重180~220 g,由我院实验动物中心提供,标准颗粒喂养,自由取食,饮水不限。本研究获得锦州医科大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 方 法

1.2.1 细胞分组:取出液氮中冻存的SV-HUC-1细胞,置于37℃水浴锅中晃动融化后,乙醇消毒。将液体倒入含有10 mL培养基的离心管中,应用DMEM培养基+10%胎牛血清在37℃、5%CO₂培养箱中培养。细胞复苏呈贴壁生长,状态良好。分别应用5、10和15 Gy的X线照射SV-HUC-1细胞24、48和72 h,将未行照射的SV-HUC-1细胞作为正常对照组。

应用Lipofectamine 3000(美国赛默飞世尔科技公司)将siRNA-NF-κB质粒(上海碧云天公司合成)转染至15 Gy X线照射72 h后的细胞株,建立siRNA-NF-κB组(si-NF-κB组),将未转染质粒的15 Gy X线照射72 h后的细胞株作为空白对照组。

1.2.2 细胞增殖活性的检测:选择si-NF-κB组和空白对照组的细胞株制成细胞悬液,调整细胞密度为 $3.0 \times 10^4/\text{mL}$ 。96孔板孔内接种100 μL细胞悬液(约 3.0×10^3 个细胞),每组3个复孔。在24、48、72 h时分别加入CCK-8试剂10 μL(上海生工生物公司),1 h后

用酶标仪(美国Thermo公司)测定各孔在450 nm处的吸光度值。

1.2.3 NF-κB和IL-6 mRNA表达的检测:应用荧光实时定量PCR(qRT-PCR)检测NF-κB和IL-6 mRNA。TRIzol抽提总RNA,逆转录获取cDNA。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列:NF-κB,正向5'-CGAACTGTGTGGTTACTCCCTA-3',反向5'-CAACGTCCGTCCTAGACTGCGT-3';IL-6,正向5'-CACTGTGCACGTCACCGGTGTAATA-3',反向5'-CAATCACGTGTGTGGTTATCCCGT-3';以U6为内参,正向5'-CTGATTTTACTCCCCTGACTG-3',反向5'-GATCGGGTTTCCCCTCAAGCT-3'。扩增程序:5℃预变性5 min;95℃ 10 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共35个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算NF-κB和IL-6 mRNA的表达量。 $\Delta\Delta Ct = [Ct_{目的基因(未知样品)} - Ct_{对照(未知样品)}] - [Ct_{目的基因(校正样品)} - Ct_{对照(校正样品)}]$ 。

1.2.4 IL-6蛋白的检测:应用Western blotting检测IL-6蛋白。IL-6浓缩液购自武汉博士德生物工程有限公司,IL-6稀释浓度为1:2 000,内参为β-actin(稀释浓度为1:2 000)。按说明书操作,经湿转法转到PVDF膜,显影。应用ImageJ软件行灰度分析,对目的蛋白与β-actin的比值进行半定量分析。

1.2.5 放射性膀胱损伤大鼠模型的建立和分组:将20只雄性SD大鼠随机分为模型组和对照组,每组10只。模型组建立放射性膀胱损伤模型。大鼠用10%水合氯醛溶液(400 mg/kg)腹腔注射麻醉,采用钴60治疗机进行全膀胱区单次照射(照射野大小约2 cm × 3 cm),一次性给予,剂量为20 Gy。铅块遮挡其余部位,照射后在温暖动物箱中复苏。于照射后第2周处死大鼠。对照组大鼠麻醉方法同模型组,放入机房而不进行照射。之后与模型组大鼠同时置于动物箱中,2周后处死。切取2组大鼠的膀胱组织,一部分立即置于-80℃冰箱中冻存待检,一部分制作石蜡包埋组织。

1.2.6 HE染色观察放射性膀胱损伤的病变特征:应用HE染色观察膀胱的病变特征,石蜡包埋组织,脱蜡、染色、透明后封片。细胞核显色为蓝色,细胞质显色为红色。

1.3 统计 学 分 析

应用SAS 6.12软件处理数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先行方差齐性检测和正态性

检验,2组间比较采用独立样本*t*检验,多组间比较采用方差分析,并应用SNK法进行两两比较。计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。相关性分析应用线性相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 X线具有剂量和时间依赖性细胞毒性

与正常对照组比较,SV-HUC-1细胞在应用5、10和15 Gy的X线照射48和72 h时细胞增殖活性均明显

下降($P < 0.05$),其中15 Gy的X线照射72 h时下降最明显。见表1。

2.2 不同时点和不同剂量X线照射后细胞中NF- κ B和IL-6 mRNA表达的比较

与正常对照组比较,SV-HUC-1细胞在应用5、10和15 Gy的X线照射48和72 h时NF- κ B和IL-6 mRNA表达均明显升高($P < 0.05$),其中15 Gy X线照射72 h时升高最明显。见表1。

2.3 siRNA-NF- κ B转染后细胞中IL-6蛋白的表达

表1 不同时点和不同剂量X线照射后细胞增殖活性以及NF- κ B、IL-6 mRNA表达的比较

Tab.1 Comparison of cell proliferative activity and expression of NF- κ B and IL-6 mRNA at different time points following irradiation with different doses of X-rays

Time point	Cell proliferative activity	F	P	NF- κ B mRNA	F	P	IL-6 mRNA	F	P
24 h		0.82	0.413		0.18	0.910		0.05	0.985
Normal control group	1.00 ± 0.02			1.02 ± 0.12			1.01 ± 0.02		
5 Gy irradiation group	0.98 ± 0.03			1.08 ± 0.13			1.04 ± 0.16		
10 Gy irradiation group	0.95 ± 0.05			1.09 ± 0.14			1.05 ± 0.17		
15 Gy irradiation group	0.90 ± 0.08			1.05 ± 0.11			1.06 ± 0.18		
48 h		4.34	0.043		5.43	0.025		27.00	<0.001
Normal control group	1.00 ± 0.04			1.03 ± 0.13			1.02 ± 0.04		
5 Gy irradiation group	0.80 ± 0.12 ¹⁾			1.23 ± 0.11 ¹⁾			1.31 ± 0.04 ¹⁾		
10 Gy irradiation group	0.75 ± 0.11 ¹⁾			1.24 ± 0.02 ¹⁾			1.34 ± 0.09 ¹⁾		
15 Gy irradiation group	0.71 ± 0.13 ¹⁾			1.29 ± 0.05 ¹⁾			1.43 ± 0.07 ¹⁾		
72 h		60.86	<0.001		5.94	0.020		5.73	0.022
Normal control group	1.00 ± 0.03			1.04 ± 0.13			1.03 ± 0.03		
5 Gy irradiation group	0.42 ± 0.13 ¹⁾			1.42 ± 0.22 ¹⁾			1.67 ± 0.28		
10 Gy irradiation group	0.34 ± 0.05 ^{1),2)}			1.65 ± 0.31 ^{1),2)}			1.85 ± 0.37 ^{1),2)}		
15 Gy irradiation group	0.23 ± 0.06 ^{1),2),3)}			1.89 ± 0.32 ^{1),2),3)}			1.97 ± 0.39 ^{1),2),3)}		

1) $P < 0.05$ vs. normal control group; 2) $P < 0.05$ vs. 5 Gy irradiation group; 3) $P < 0.05$ vs. 10 Gy irradiation group.

Western blotting结果显示,与空白对照组(1.32 ± 0.21)比较,si-NF- κ B组(15 Gy的X线照射72 h)细胞中IL-6蛋白的表达(0.96 ± 0.10)明显下降($P < 0.05$)。见图1。

2.4 放射性膀胱损伤大鼠模型的病变特征

模型组大鼠膀胱黏膜表面的伞细胞脱落,部分尿路上皮脱落,间质成纤维细胞增生,伴淋巴细胞、浆细胞和少许中性粒细胞浸润,部分区域伴水肿,小血管增生。对照组大鼠的正常膀胱黏膜组织中,可见黏膜组织中尿路上皮层次明显,表面可见伞细胞,黏膜下层组织疏松,炎症细胞极少。见图2。

2.5 大鼠膀胱组织中NF- κ B和IL-6 mRNA表达

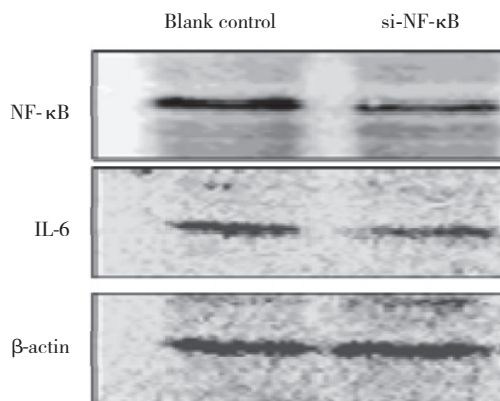


图1 2组细胞中IL-6蛋白的表达

Fig.1 Comparison of IL-6 protein expression in cells between the two groups

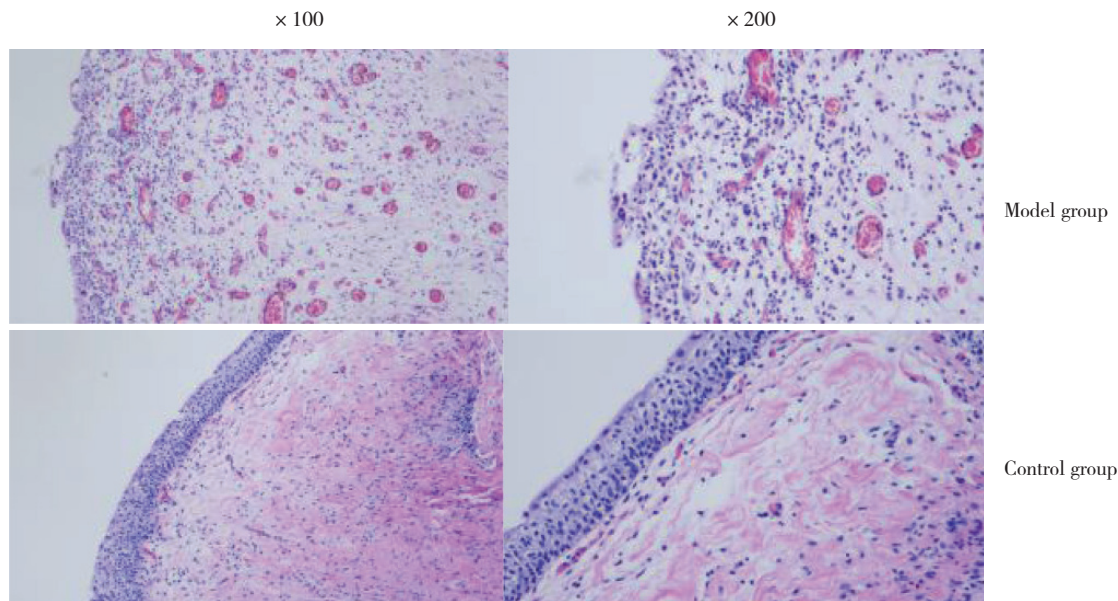


图2 2组大鼠膀胱黏膜HE染色结果

Fig.2 Images of HE-stained tissue sections of rat urinary bladder mucosa

模型组大鼠膀胱组织中NF-κB和IL-6 mRNA的表达明显高于对照组 ($P < 0.05$)。见表2。

2.6 放射性膀胱损伤大鼠膀胱组织中NF-κB和IL-6 mRNA表达的相关性

线性相关分析结果显示,放射性膀胱损伤大鼠膀胱组织中NF-κB和IL-6 mRNA的表达呈正相关 ($P < 0.05$)。见图3。

3 讨论

电离辐射广泛用于临床和基础研究领域,机体组织在电离辐射时发生不同程度的损伤。肿瘤放射治疗是应用放射线治疗肿瘤的方法,对盆腔和腹部肿瘤进行局部治疗时易引起膀胱损伤。放射性膀胱损伤常发生在早期阶段^[4]。近年来,学者发现多

表2 2组大鼠膀胱组织中NF-κB和IL-6 mRNA表达的比较

Tab.2 Comparison of NF-κB and IL-6 mRNA expression in rat urinary bladder tissues between the two groups

Item	Model group (n = 10)	Control group (n = 10)	t	P
NF-κB mRNA	2.31 ± 0.25	1.02 ± 0.15	13.91	<0.001
IL-6 mRNA	2.65 ± 0.42	1.44 ± 0.23	8.00	<0.001

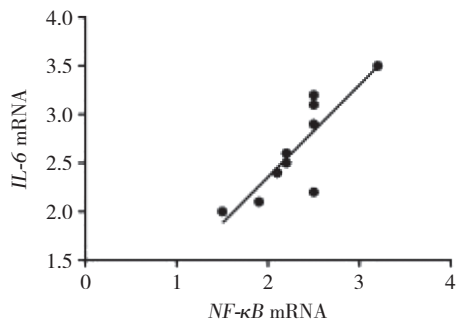


图3 放射性膀胱损伤大鼠膀胱组织中NF-κB和IL-6 mRNA表达的相关性

Fig.3 Correlation of NF-κB and IL-6 mRNA expression in urinary bladder tissues of rats with radiation-induced bladder injury

个与损伤相关的因子,其中包括NF-κB。研究发现,NF-κB在放射性肺损伤^[5]、放射性胰腺损伤^[6]的病变组织中表达均升高,并在血管内皮细胞和上皮细胞中能检测到NF-κB少量表达,放射线刺激诱导的放射性损伤组织也能产生一定量的NF-κB^[7]。也有研究^[8]发现微生物和促炎性细胞因子均能引起NF-κB活化,这种活化作用与IκB激酶的磷酸化和泛素化降解过程相关,活化后的NF-κB诱导下游的多个靶基因发挥生物学作用。也有研究^[9]认为,NF-κB可能是白细胞介素家族重要的诱导因子,是一种控制编码

细胞因子的转录因子。

本研究结果显示,尿路上皮细胞的增殖活性随着X线剂量和照射时间的增加而降低,提示电离辐射对细胞增殖有明显的抑制作用,这是膀胱黏膜损伤的重要的机制。本研究发现,*NF-κB*和*IL-6* mRNA表达随着X线剂量和照射时间的增加而增加,且二者具有靶向调控作用,共同作用在损伤过程中。放射性膀胱损伤大鼠模型的膀胱病变组织中能观察到典型的损伤形成,由于膀胱黏膜和伞细胞脱落^[10],黏膜下层裸露,间质成纤维细胞表现出修复性增生,同时伴有明显的放射性炎性病变,表现为淋巴细胞、浆细胞和少许中性粒细胞浸润,部分区域伴水肿^[11-12]。本研究的动物实验结果显示,大鼠膀胱病变组织中*NF-κB*和*IL-6* mRNA高表达,且呈正相关性。不仅证实了*NF-κB*和*IL-6*在损伤性病变中的特征,还间接验证了二者的靶向关系。*NF-κB*可能是*IL-6*的上游因子,活化后表达为持续性炎症损伤,同时伴有修复性改变。也有研究^[3]认为,*IL-6*能刺激*NF-κB*信号通路活化,通过信号转导途径,引起抑制性κB蛋白解离^[3],*NF-κB*发生核易位,进入细胞核与靶因子嵌合,激活靶因子的转录活性。因此,二者可能是环状循环。*NF-κB*可能是更核心的因子,活化后的*NF-κB*具有以下功能:(1)促使巨噬细胞产生血小板源性生长因子、肿瘤坏死因子和多种白细胞介素家族因子,促进炎症渗出和聚集^[13];(2)引起成纤维细胞分裂、繁殖和增生;(3)促进成纤维细胞胶原化^[14-15];(4)促进黏膜下间质水肿的形成。

综上所述,X线对膀胱的损伤具有浓度和时间依赖性细胞毒性,病变形成过程中*NF-κB*和*IL-6*的表达升高且具有协同作用。但是,*NF-κB*和*IL-6*调控的具体生物学特性还需后续研究进一步明确。

参考文献:

- [1] SARSARSHAHI S, MADJD Z, BOZSAKY E, et al. An evaluation of the effect of bortezomib on radiation-induced urinary bladder dysfunction [J]. *Strahlenther Onkol*, 2019, 195 (10): 934-939. DOI: 10.1007/s00066-019-01497-8.
- [2] KRISCHAK A, KOWALIUK J, SARSARSHAHI S, et al. Effect of

- irradiation on the expression of E-cadherin and β-catenin in early and late radiation sequelae of the urinary bladder and its modulation by NF-κB inhibitor thalidomide [J]. *Strahlenther Onkol*, 2021, 197 (6): 537-546. DOI: 10.1007/s00066-021-01751-y.
- [3] ZHANG S, XU W, WANG H, et al. Inhibition of CREB-mediated ZO-1 and activation of NF-κB-induced IL-6 by colonic epithelial MCT4 destroys intestinal barrier function [J]. *Cell Prolif*, 2019; 52 (6): e12673. DOI: 10.1111/cpr.12673.
- [4] 唐玲荣, 李光. 食管癌放射治疗中或放射治疗后并发食管穿孔的临床分析 [J]. *中国医科大学学报*, 2018, 47 (5): 439-442. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2018.05.013.
- [5] ZHENG L, ZHU Q, XU C, et al. Glycyrrhizin mitigates radiation-induced acute lung injury by inhibiting the HMGB1/TLR4 signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (1): 214-226. DOI: 10.1111/jemm.14703.
- [6] WYDMANSKI J, POLANOWSKI P, TUKIENDORF A, et al. Radiation-induced injury of the exocrine pancreas after chemoradiotherapy for gastric cancer [J]. *Radiother Oncol*, 2016, 118 (3): 535-539. DOI: 10.1016/j.radonc.2015.11.033.
- [7] WU P, OREN O, GERTZ MA, et al. Proteasome inhibitor-related cardiotoxicity: mechanisms, diagnosis, and management [J]. *Curr Oncol Rep*, 2020, 22 (7): 66. DOI: 10.1007/s11912-020-00931-w.
- [8] JING N, FANG B, LI Z, et al. Exogenous activation of cannabinoid-2 receptor modulates TLR4/MMP9 expression in a spinal cord ischemia reperfusion rat model [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17 (1): 101. DOI: 10.1186/s12974-020-01784-7.
- [9] PARK SH, KIM JY, KIM JM, et al. PM014 attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis via regulating NF-κB and TGF-β1/NOX4 pathways [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 16112. DOI: 10.1038/s41598-020-72629-9.
- [10] 黄骥, 涂新华, 温晓明. 透明质酸钠用于放射性膀胱炎的临床研究 [J]. *实用癌症杂志*, 2021, 36 (11): 1913-1914. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5930.2021.11.047.
- [11] ZWAANS BMM, WEGNER KA, BARTOLONE SN, et al. Radiation cystitis modeling: a comparative study of bladder fibrosis radiosensitivity in C57BL/6, C3H, and BALB/c mice [J]. *Physiol Rep*, 2020, 8 (4): e14377. DOI: 10.14814/phy2.14377.
- [12] SPINELLI AE, BRESOLIN A, ZUPPONE S, et al. A non-invasive ultrasound imaging method to measure acute radiation-induced bladder wall thickening in rats [J]. *Radiat Oncol*, 2020, 15 (1): 240. DOI: 10.1186/s13014-020-01684-3.
- [13] WANG H, AHN KS, ALHARBI SA, et al. Celastrol alleviates gamma irradiation-induced damage by modulating diverse inflammatory mediators [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (3): 1084. DOI: 10.3390/ijms21031084.
- [14] 庞久玲, 刘爱东, 刘军. 转化生长因子β1和基质金属蛋白酶在病理性瘢痕中的表达及意义 [J]. *实用医学杂志*, 2010, 26 (17): 3175-3177. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2010.17.042.
- [15] 刘爱东, 张爽, 王丹琳, 等. MMP-19在胃癌中的表达及与神经型钙黏素的相关性 [J]. *重庆医科大学学报*, 2022, 47 (2): 145-150. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002935.

(编辑 陈 姜)