

# apocynin 对急性坏死性胰腺炎大鼠肺组织的保护作用



夏鹤<sup>1</sup>, 杨晓佳<sup>1,2</sup>, 洪育蒲<sup>1,2</sup>, 梅方超<sup>1,2</sup>, 王卫星<sup>1</sup>

1. 武汉大学人民医院普通外科 (武汉 430060)
2. 消化系统疾病湖北省重点实验室 (武汉 430060)

**【摘要】** 目的 探讨还原型辅酶 II 氧化酶 (NOX2) 抑制剂 apocynin 对急性坏死性胰腺炎 (ANP) 模型大鼠肺组织的保护作用。方法 40 只 SPF 级 Wistar 大鼠采用完全随机法随机分为 4 组: 假手术组 (SO 组, 10 只)、ANP 模型组 (ANP 组, 12 只)、apocynin 治疗组 (APO 组, 10 只) 及 APO 药物对照组 (APO-CON 组, 8 只)。采用胆胰管逆行注射 5% 牛磺胆酸钠溶液制备 ANP 模型, 造模前 30 min 时 APO 组注射 APO 干预, APO-CON 组和 SO 组仅开腹翻动胰腺和十二指肠同时在相同时间点分别注射 apocynin 和 10% 二甲基亚砷干预。各组手术后 12 h 经大鼠下腔静脉取血并处死大鼠后取肺组织, 检测大鼠血清淀粉酶和脂肪酶水平, 采用免疫组织化学方法检测肺组织中核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  和 NOX2 蛋白表达, 用免疫荧光法检测肺组织中髓过氧化物酶 (MPO)、Toll 样受体 4 (TLR4) 和 CD68 蛋白表达, 采用 ELISA 法检测丙二醛 (MDA) 浓度及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。结果 与 SO 组比较, ANP 组大鼠血清淀粉酶和脂肪酶水平以及肺组织中 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、NOX2、MPO、TLR4、CD68 蛋白表达及 MDA 浓度均明显升高 ( $P < 0.05$ ), 与 ANP 组比较, APO 组的上述指标均明显降低 ( $P < 0.05$ ); SOD 水平在 ANP 组明显低于 SO 组 ( $P < 0.05$ ), 而其在 APO 组明显高于 ANP 组 ( $P < 0.05$ )。结论 apocynin 可通过抑制 NOX2 活性改善大鼠 ANP 症状并减轻肺损伤。

**【关键词】** 急性坏死性胰腺炎; 还原型辅酶 II 氧化酶; 肺损伤

## Protective effect of apocynin on lung injury induced by acute necrotic pancreatitis in rat

XIA He<sup>1</sup>, YANG Xiaojia<sup>1,2</sup>, HONG Yupu<sup>1,2</sup>, MEI Fangchao<sup>1,2</sup>, WANG Weixing<sup>1</sup>

1. Department of General Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, P. R. China

2. Key Laboratory of Hubei Province for Digestive System Disease, Wuhan 430060, P. R. China

Corresponding author: WANG Weixing, Email: sate.llite@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate protective effect of apocynin, the inhibitor of NADPH oxidase II (NOX2), on lung injury induced by acute necrotic pancreatitis (ANP) in rat. **Methods** Forty SPF adult male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: shame operation group (SO group,  $n=10$ ), ANP model group (ANP group,  $n=12$ ), apocynin treated group (APO group,  $n=10$ ), and apocynin control group (APO-CON group,  $n=8$ ). The ANP models were induced by the retrograde injection of 5% sodium taurocholate through the biliopancreatic duct in the ANP group and the APO group. The apocynin was injected at 30 min before the induction of ANP models in the APO group. The pancreas and duodenum of rats were just flipped and the apocynin and the 10% DMSO (2 mL/kg) were injected in the APO-CON group and SO group respectively. All the rats were sacrificed at 12 h after the operation. The blood samples were collected by the inferior vena cava puncture, and the levels of serum amylase and lipase were measured by the auto-chemistry analyzer. The lung tissues were harvested and the integrated optical densities (IODs) of the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and NOX2 were detected by the immunohistochemistry assay. The IODs of the myeloperoxidase (MPO), toll like receptor 4 (TLR4), and CD68 were detected by the immunofluorescence assay. The concentration of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) were tested by the ELISA method. **Results** The levels of the serum amylase and lipase and the IODs of the NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , NOX2, MPO, TLR4, CD68, and

DOI: 10.7507/1007-9424.201804017

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (项目编号: 81370562)

通信作者: 王卫星, Email: sate.llite@163.com

concentration of MDA of the lung tissues in the ANP group were significantly increased as compared with the SO group ( $P < 0.05$ ), these indices in the APO group were significantly decreased as compared with the ANP group ( $P < 0.05$ ). The SOD activity of the lung tissue in the ANP group was significantly decreased as compared with the SO group ( $P < 0.05$ ), which in the APO group was significantly increased as compared with the ANP group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Apocynin can ameliorate lung injury induced by ANP through inhibiting activity of NOX2.

**【Keywords】** acute necrotic pancreatitis; NADPH oxidase II; lung injury

急性坏死性胰腺炎 (acute necrotic pancreatitis, ANP) 是由多种病因引起酶原异常激活的疾病, 主要表现为坏死性炎症<sup>[1]</sup>, 易引发全身炎症反应综合征, 可进展为肺、肾、肝、肠道等多器官损伤<sup>[2]</sup>, 病死率高达 40%<sup>[3]</sup>。有研究<sup>[4]</sup>证实, 肺是 ANP 时器官损伤的主要器官之一, 而氧自由基是 ANP 肺损伤的关键因素。还原性辅酶 II 氧化酶 (NADPH oxidase 2, NOX2) 是肺微小血管活性氧的主要来源<sup>[5]</sup>。本研究通过使用 NOX2 特异性抑制剂——香草乙酮 (4'-羟基-3-甲氧基苯乙酮, apocynin) 下调 NOX2 的活性, 以此探讨其在减轻 ANP 肺损伤中的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO) 和牛磺胆酸钠购自 Sigma 公司, 以无菌生理盐水配制到合适浓度; Apocynin 购自 Santa 公司, 以 DMSO 溶解至所需浓度。抗 NOX2 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 免疫荧光二抗购自 Abcam 公司。EliVision Super 检测试剂盒购自福建迈新生物技术开发有限公司 (KIT-9921), DAB 试剂盒购自武汉谷歌生物技术有限公司。

### 1.2 实验动物及分组

无特定病原体 (special pathogen free, SPF) 级 Wistar 大鼠 40 只 (由湖北省疾病预防控制中心提供), 体质量 200 ~ 250 g。所有大鼠在标准环境下自由进食、进水。饲养适应 3 ~ 4 d 后采用完全随机法随机分为 4 组: 假手术组 (SO 组,  $n=10$ )、ANP 模型组 (ANP 组,  $n=12$ )、APO 治疗组 (APO 组,  $n=10$ ) 及 APO 药物对照组 (APO-CON 组,  $n=8$ )。

### 1.3 模型制备及干预

大鼠手术前禁食 12 h, 自由饮水, 称体质量。ANP 组及 APO 组造模使用异氟烷气体吸入麻醉, 铺巾后无菌操作下行上腹正中切口进腹, 采用钝性细针头通过十二指肠壁, 经乳头逆行穿刺胆胰管, 用无损伤血管夹分别夹闭肝门处的胆总管及针头插入部位的胆胰管, 向胆胰管恒速 (0.1 mL/min) 注

入 5% 牛磺胆酸钠 (1 mL/kg), 注射完毕后, 原位夹闭主胰管 5 min 后肉眼见胰腺出现水肿、出血、坏死时即表明 ANP 造模成功, 逐层关腹缝合。术后皮下生理盐水 2 mL/kg 补液。APO 组在造模前 30 min 经股静脉注射 10% DMSO 溶解的 APO (50 mg/kg), APO-CON 组和 SO 组在与 APO 组相同时间点分别经股静脉注射 10% DMSO 溶解的 APO (50 mg/kg) 和 10% DMSO (2 mL/kg), APO-CON 组和 SO 组麻醉及切口方式均与 ANP 组相同, 仅翻动胰腺和十二指肠后即关腹。

### 1.4 标本采集及制备

4 组大鼠术后 12 h 时使用异氟烷再次麻醉, 在无菌环境中行腹正中切口进腹, 下腔静脉快速采血 (4 ~ 5 mL) 后处死大鼠, 血液标本在 4 °C 环境下 4 000 r/min ( $r=10$  cm) 离心 15 min 后于 -20 °C 保存备用。取胰头及肺组织 4% 多聚甲醛固定 24 h, 行石蜡包埋切片, 行苏木精-伊红 (HE) 染色以及免疫组织化学和免疫荧光切片的制作。

### 1.5 生物化学指标检测

采用武汉大学人民医院检验科全自动生化分析仪 (强生公司) 测定血清淀粉酶 (amylase, AMY) 及脂肪酶 (lipase, LIP) 水平。大鼠肺组织中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 浓度及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性分别使用 MDA 试剂盒 (南京建成生物 A003-1) 和 SOD 测定试剂盒 (南京建成生物 A001-1) 测定。

### 1.6 免疫荧光法检测 CD68、髓过氧化物酶 (MPO) 及 Toll 样受体 4 (TLR4) 表达

检测选取具有代表性的石蜡包埋切片, 经脱蜡、水化、抗原修复后冷却至室温, 0.2% Triton-X100 破膜处理 45 min, 10% 驴血清封闭 1 h, 一抗使用兔抗 CD68 (1 : 200)、兔抗 MPO (1 : 400)、兔抗 TLR4 (1 : 200) 孵育后 4 °C 过夜, 荧光二抗以兔抗 (波长  $\lambda=488$ , Abcam) 标记 CD68 和 MPO、以鼠抗 (波长  $\lambda=555$ , Abcam) 标记 TLR4, 孵育 1 h 后以含 DAPI 的封片树脂封片 (Abcam, ab104139)。免疫荧光切片均在显微镜下阅片后经 Image-pro plus 6.0 专业图像分析软件统计阳性荧光信号的累积光

密度 (integrated optical density, IOD) 作为结果判定标准。

### 1.7 免疫组织化学法检测 NOX2、核因子-κB (NF-κB) 及肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 蛋白表达

检测选取具有代表性的切片, 经脱蜡、水化、抗原修复后冷却至室温, 3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶, 一抗 (NOX2、NF-κB 及 TNF-α) 孵育后 4 ℃ 过夜, 二抗孵育后经 DAB 显色, 苏木精染色, 盐酸乙醇分化后脱水、封片。免疫组织化学染色切片在显微镜下阅片, 以组织被染成棕黄色为阳性, 使用专业图像分析软件 Image pro plus 6.0 统计切片棕黄色区域的平均光密度, 采用累计光密度/面积 (IOD/Area) 作为结果判定标准。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析, 符合正态分布的计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 法。计数资料以率或构成比表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 4 组大鼠血清 AMY 和 LIP 水平变化情况

大鼠血清 AMY 和 LIP 水平在 ANP 组均明显高于 SO 组 ( $P<0.05$ )、APO 组 ( $P<0.05$ ) 和 APO-CON 组 ( $P<0.05$ ), 其在 APO 组仍明显高于 SO 组 ( $P<0.05$ ) 和 APO-CON 组 ( $P<0.05$ ), 在 APO-CON 组和 SO 组间比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见图 1。

### 2.2 4 组大鼠肺组织中 MDA 浓度及 SOD 活性变化情况

① 大鼠肺组织中 MDA 浓度在 ANP 组明显高于 SO 组 ( $P<0.05$ )、APO 组 ( $P<0.05$ ) 和 APO-CON 组 ( $P<0.05$ ), 其在 APO 组明显也明显高于 SO 组 ( $P<0.05$ ) 和 APO-CON 组 ( $P<0.05$ ), 在 APO-CON

组和 SO 组间比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

② 大鼠肺组织中 SOD 活性在 ANP 组明显低于 SO 组 ( $P<0.05$ )、APO 组 ( $P<0.05$ ) 和 APO-CON 组 ( $P<0.05$ ), 其在 APO 组明显明显低于 SO 组 ( $P<0.05$ ) 和 APO-CON 组 ( $P<0.05$ ), 在 APO-CON 组和 SO 组间比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见图 2。

### 2.3 4 组大鼠肺组织中 NF-κB、NOX2 及 TNF-α 蛋白表达结果

大鼠肺组织中 NF-κB、NOX2 和 TNF-α 蛋白表达的免疫组织化学染色的定性结果见图 3, 半定量结果见图 4。

**2.3.1 NF-κB 蛋白表达** NF-κB 蛋白阳性表达为视野内细胞质及细胞核或单纯细胞核被染成棕黄色 (图 3a)。SO 组大鼠肺组织中 NF-κB 阳性表达细胞较少, 棕黄色染色多单纯分布在细胞质中; ANP 组相较于 SO 组 NF-κB 蛋白阳性表达增高 ( $P<0.05$ ), APO 组阳性表达较 ANP 组降低 ( $P<0.05$ ), 但其相对 SO 组 ( $P<0.05$ ) 和 APO-CON 组仍增高 ( $P<0.05$ ), 见图 4a。

**2.3.2 NOX2 蛋白表达** NOX2 阳性表达为视野内细胞质被染成棕黄色 (图 3b)。SO 组大鼠肺组织中 NOX2 阳性表达细胞较少, ANP 组相较于 SO 组、APO 组及 APO-CON 组 NOX2 阳性表达增高 ( $P<0.05$ ), APO 组相较于 APO-CON 组 ( $P<0.05$ ) 和 SO 组其阳性表达增高 ( $P<0.05$ ), SO 组与 APO-CON 组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见图 4b。

**2.3.3 TNF-α 蛋白表达** TNF-α 染色阳性表达为视野内细胞质被染成棕黄色 (图 3c)。ANP 组相对于 SO 组, TNF-α 染色可见血管旁成团阳性表达细胞及部分散在于肺组织内的阳性表达细胞, 蛋白阳性表达明显上升 ( $P<0.05$ )。APO 组相较于 ANP 组蛋白阳性表达降低 ( $P<0.05$ ), 但相对于 SO 组

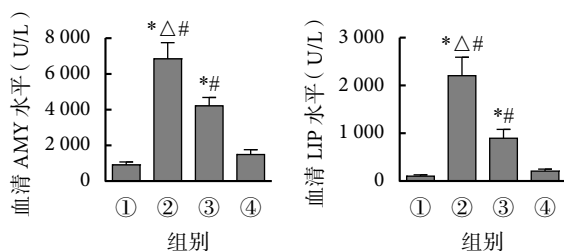


图 1 示大鼠血清 AMY 和 LIP 水平变化

a: AMY 水平; b: LIP 水平。1: SO 组; 2: ANP 组; 3: APO 组; 4: APO-CON 组。与 SO 组比较, \* $P<0.05$ ; 与 APO 组比较, Δ $P<0.05$ ; 与 APO-CON 组比较, # $P<0.05$

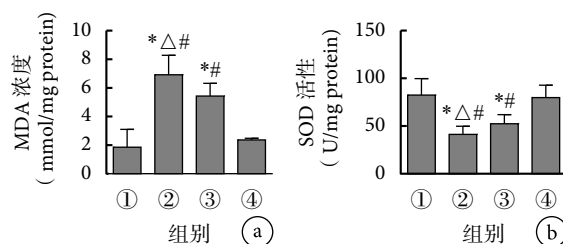


图 2 示大鼠血清 MDA 浓度和 SOD 活性变化

a: MDA 浓度; b: SOD 活性。1: SO 组; 2: ANP 组; 3: APO 组; 4: APO-CON 组。与 SO 组比较, \* $P<0.05$ ; 与 APO 组比较, Δ $P<0.05$ ; 与 APO-CON 组比较, # $P<0.05$

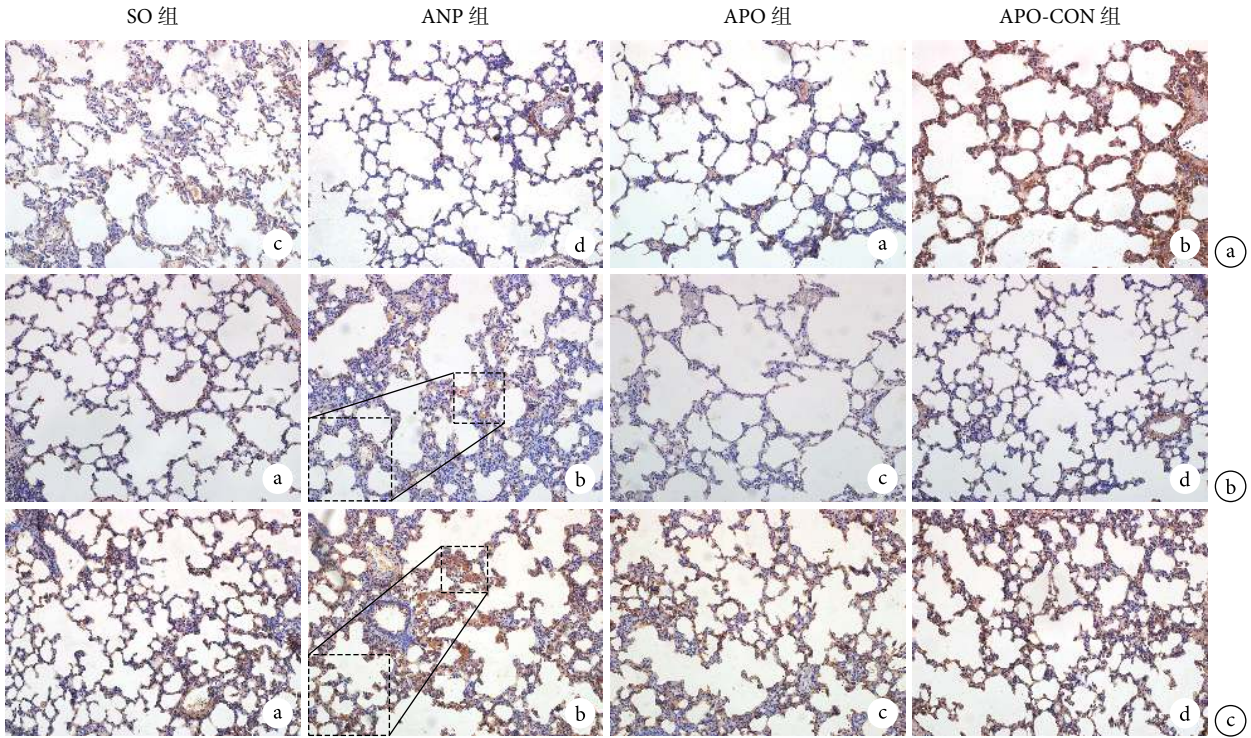


图3 示大鼠肺组织中 NF-κB、NOX2 及 TNF-α 蛋白表达的定性结果 (免疫组织化学染色 ×200)

a: NF-κB; b: NOX2; c: TNF-α。虚线框内展示的是浸润的 NOX2 和 TNF-α 阳性细胞

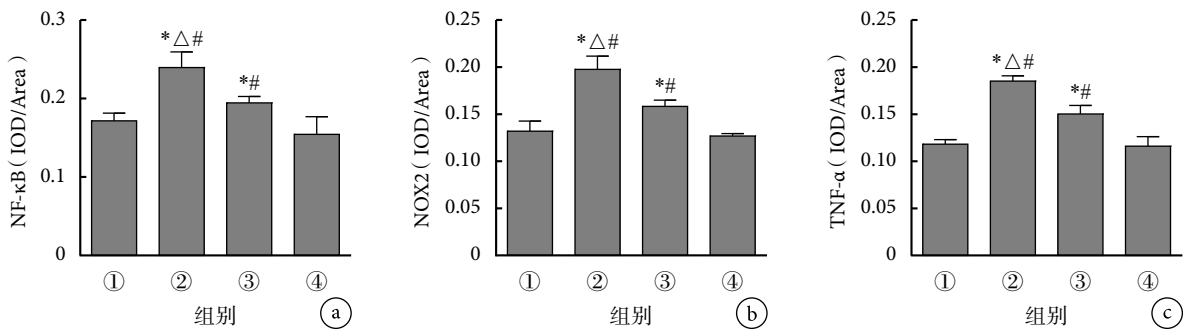


图4 示免疫组织化学染色法检测大鼠肺组织中 NF-κB、NOX2 及 TNF-α 蛋白表达的半定量结果

a: NF-κB; b: TNF-α; c: NOX2。1: SO组; 2: ANP组; 3: APO组; 4: APO-CON组。与SO组比较, \* $P < 0.05$ ; 与APO组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与APO-CON组比较, # $P < 0.05$

( $P < 0.05$ ) 和 APO-CON 组仍上升 ( $P < 0.05$ )。SO 组和 APO-CON 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 4c。

#### 2.4 大鼠肺组织中 MPO、CD68 和 TLR4 的表达

大鼠肺组织中 MPO、CD68 和 TLR4 免疫荧光法检测的定性结果见图 5, 半定量结果见图 6。

**2.4.1 MPO** 大鼠 MPO 荧光阳性表达为视野内有核细胞的细胞质被激发绿色荧光 ( $\lambda = 488$ )。相对于 SO 组, ANP 组可见血管旁成团阳性表达的细胞及分布于肺组织间的阳性表达细胞, 其 IOD 值明显上升 ( $P < 0.05$ ), APO 组相对于 ANP 组明显下降 ( $P < 0.05$ ), 但相对于 SO 组 ( $P < 0.05$ ) 和 APO-CON

组仍上升 ( $P < 0.05$ ), SO 组和 APO-CON 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 6a。

**2.4.2 CD68 和 TLR4** 大鼠 CD68 和 TLR4 双标荧光的阳性表达为视野内有核细胞的细胞质被激发绿色荧光 (CD68,  $\lambda = 488$ ) 和红色荧光 (TLR4,  $\lambda = 555$ )。ANP 组少见单纯 CD68 阳性细胞、单纯 TLR4 阳性细胞部分分布在组织间, 双标阳性细胞多分布于血管旁和组织间。IOD 值在 ANP 组明显高于 SO 组 ( $P < 0.05$ ), APO 组明显低于 ANP 组 ( $P < 0.05$ ), 但仍明显高于 APO-CON 组 ( $P < 0.05$ ) 和 SO 组 ( $P < 0.05$ ), APO-CON 组和 SO 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 6b 和图 6c。

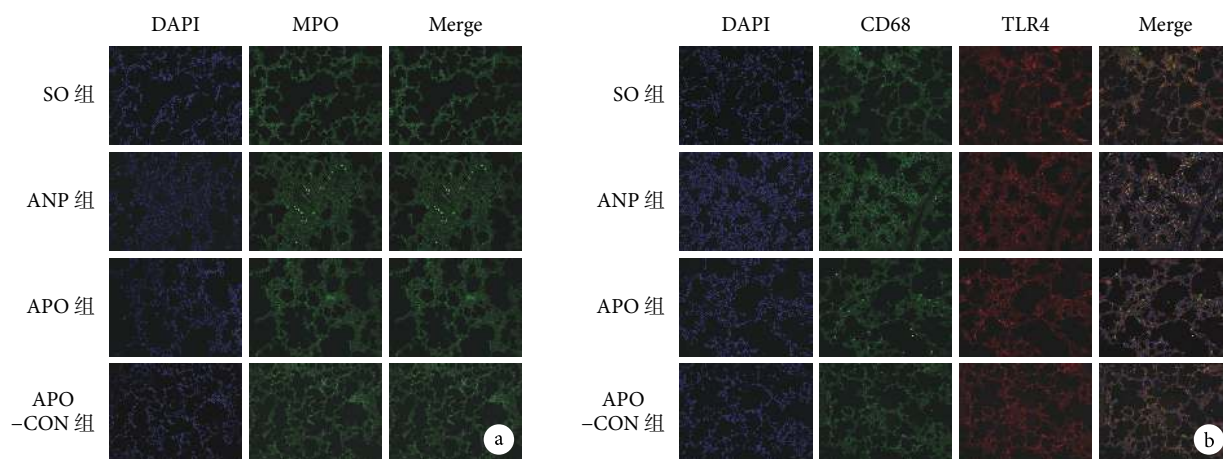


图 5 示大鼠肺组织中 MPO 和 CD68、TLR4 表达结果 (免疫荧光染色 ×200)

a: MPO; b: CD68 和 TLR4

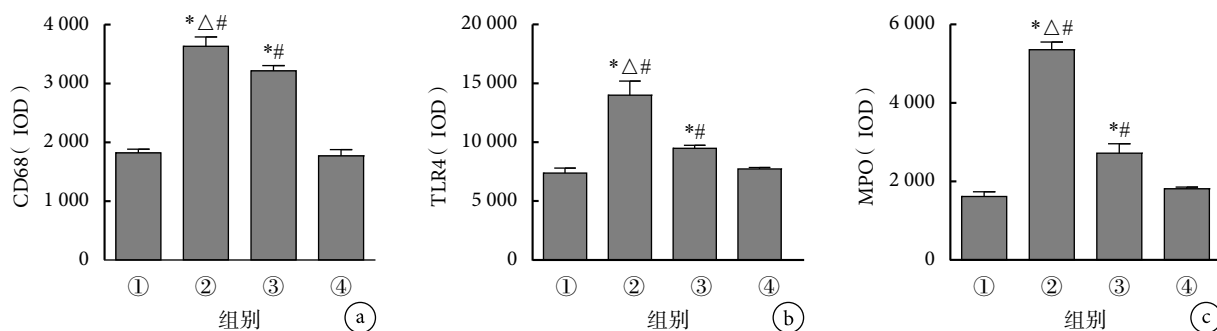


图 6 示大鼠肺组织中 MPO、CD68 和 TLR4 免疫荧光染色的 IOD 分析结果

a: CD68; b: TLR4; c: MPO. 1: SO 组; 2: ANP 组; 3: APO 组; 4: APO-CON 组。与 SO 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 APO 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 APO-CON 组比较, # $P < 0.05$

### 3 讨论

ANP 是一种具有高致死率的临床重症<sup>[6]</sup>, 伴发多器官功能障碍的 ANP 患者的死亡率高达 40%<sup>[7]</sup>, 但至今仍无针对性药物或临床疗法。在 ANP 伴发的多器官损伤中肺是 ANP 并发多器官损伤的主要器官之一<sup>[5]</sup>。ANP 发病后常能够观察到肺组织肺泡壁增厚、炎性细胞浸润及肺水肿。一般认为肺损伤的原因为 ANP 后炎性介质到达肺小血管, 从而引发肺组织炎性介质水平和活性氧水平上升、NF- $\kappa$ B 激活等, 进而导致肺细胞死亡增加和肺功能障碍<sup>[8]</sup>。

NADPH 氧化酶即 NOX, 广泛分布于人体各组织细胞中, 主要有 NOX1 ~ NOX6 (大鼠体内缺乏 NOX5) 6 种类型<sup>[9-11]</sup>, 其中 NOX2 是 6 种 NOX 中分布最广泛的一种。以往研究<sup>[12-14]</sup>发现, NOX 在心脏、肝脏、肺脏、肠黏膜及脑缺血再灌注损伤中均起重要作用。NOX 在一般组织损伤时参与合成大量活性氧, 通过参与细胞信号转导从而激活炎症反

应, 对机体产生有益的影响<sup>[15]</sup>, 甚至可减轻由组织损伤继发的多器官功能障碍综合征<sup>[16]</sup>; 但在 ANP 中 NOX 表达水平上调和相伴随的活性氧水平升高可引起体内氧化-抗氧化系统失衡, 组织细胞内多种通路被激活<sup>[17]</sup>及 TNF- $\alpha$  水平上升, 从而引起进一步的组织损伤<sup>[18]</sup>, 加重 ANP 的总体损伤水平。apocynin 是一种 NOX 特异性抑制剂, 通过在细胞内形成同二聚体 diapocynin 抑制 NOX 活性<sup>[19]</sup>。多个研究<sup>[20-21]</sup>结果显示, apocynin 在肠损伤、胰腺损伤及脑缺血再灌注损伤中可通过抑制 NOX 活性及有效降低组织活性氧水平而起到保护作用。因此, 本研究假设 apocynin 可以通过抑制大鼠体内 NOX 活性及降低 ANP 时活性氧水平, 进一步降低 TNF- $\alpha$  表达水平, 从而对 ANP 时的肺组织起到保护作用<sup>[22]</sup>。本研究建立 ANP 模型后, 通过测量血清 AMY 和 LIP 水平反映胰腺组织损伤后 AMY 和 LIP 进入血液循环的量, 以此评估大鼠 ANP 模型造模后 12 h 时的胰腺组织损伤程度和病理改变程度, 结果显示, ANP 组大鼠均产生了严重的胰腺原位损伤, 同

时采用 apocynin 干预后, 见血清 AMY 和 LIP 水平显著下降, 该结果提示, apocynin 可以减轻 ANP 时组织损伤程度和病理改变程度, 可能对 ANP 时的肺组织起到保护作用。

MDA 是细胞内膜系统上的脂质过氧化产物, 其积累可直接反映细胞内膜结构被氧化损伤的程度。而 SOD 则是细胞清除氧自由基的常见酶类, 通过促超氧化物发生歧化反应使超氧化物失去强氧化性<sup>[23]</sup>。NF- $\kappa$ B 为常见的反映炎症水平的指标。本研究通过检测大鼠肺组织中 NF- $\kappa$ B 表达和 SOD 活性及 MDA 浓度来评估组织炎症、NF- $\kappa$ B 通路激活程度及组织氧化应激水平, 同时用 NOX2 组织免疫化学染色评估 NOX 抑制剂 apocynin 的效果。结果发现, apocynin 可有效降低肺组织中 MDA 浓度, 增强 SOD 活性, 部分降低了肺组织中 NOX2 和 NF- $\kappa$ B 表达, 结果提示, 通过 apocynin 干预可有效降低组织氧化应激。有研究<sup>[24]</sup>结果显示, NOX 及其产生的活性氧是 NF- $\kappa$ B 通路的重要激活因子, 其结果可间接证实 apocynin 可通过降低组织氧化应激程度来下调 NF- $\kappa$ B 通路的激活水平。

活性氧水平升高可激活下游细胞因子 TNF- $\alpha$  的表达、促进细胞凋亡和激活 NF- $\kappa$ B 通路, TNF- $\alpha$  可作为趋化因子介导炎性细胞的浸润。MPO 是常用的白细胞标志物, 常大量表达于髓系细胞(如单核细胞、中性粒细胞)中。CD68 多表达于单核细胞系, 常见于单核细胞、循环内巨噬细胞和组织间巨噬细胞。TLR4 属于免疫细胞模式分子受体, 可用以标记非特异性免疫类细胞(如巨噬细胞), 同时参与 NF- $\kappa$ B 通路的激活<sup>[25]</sup>。因此, 本研究采用免疫组织化学法检测 TNF- $\alpha$  和免疫荧光技术检测 MPO、CD68 和 TLR4 的表达反映组织浸润程度和大致的细胞类型, 结果发现, ANP 组相较于 SO 组有明显的 MPO 阳性细胞浸润, APO 组则以 CD68 阳性和部分 TLR4 阳性细胞浸润为主, 而 apocynin 的干预, 在总体上减少免疫细胞浸润数量的同时亦可降低 MPO 阳性细胞在浸润细胞中的比例, 使浸润细胞类型更偏向于单核-巨噬细胞系。

综上所述, NOX2 特异性抑制剂 apocynin 可通过抑制 NOX2 的活性和部分表达, 从而抑制 NF- $\kappa$ B 的活化和组织氧化应激水平, 降低炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  的表达, 进而减轻组织炎症细胞浸润, 达到保护肺组织损伤的作用, 推测组织的氧化应激可能是 ANP 外周脏器损伤的关键因素, 该结果提示, 干预组织氧化应激可能成为 ANP 治疗的众多方法中具有潜力的一种方法。但本研究中未对 APO 通过

抑制 NOX2 活性减轻 ANP 肺损伤的具体机制进行阐明, 也没有说明 APO 在氧化应激细胞信号通路中的具体作用, 这均有待于进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Manohar M, Verma AK, Venkateshaiah SU, *et al.* Pathogenic mechanisms of pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2017, 8(1): 10-25.
- 2 Zhang H, Neuhöfer P, Song L, *et al.* IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality. *J Clin Invest*, 2013, 123(3): 1019-1031.
- 3 Halonen KI, Pettilä V, Leppäniemi AK, *et al.* Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med*, 2002, 30(6): 1274-1279.
- 4 Mole DJ, Webster SP, Uings I, *et al.* Kynurenine-3-monooxygenase inhibition prevents multiple organ failure in rodent models of acute pancreatitis. *Nat Med*, 2016, 22(2): 202-209.
- 5 Bernard K, Hecker L, Luckhardt TR, *et al.* NADPH oxidases in lung health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(17): 2838-2853.
- 6 古升, 陈家诚, 周贞学, 等. 胰淀粉酶水平变化与急性胰腺炎病情严重程度的相关性分析. *中国临床研究*, 2016, 29(5): 629-631.
- 7 Pavlidis P, Crichton S, Lemmich Smith J, *et al.* Improved outcome of severe acute pancreatitis in the intensive care unit. *Crit Care Res Pract*, 2013, 2013: 897107.
- 8 Chen C, Xu S, Wang WX, *et al.* Rosiglitazone attenuates the severity of sodium taurocholate-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Arch Med Res*, 2009, 40(2): 79-88.
- 9 Cheng G, Cao Z, Xu X, *et al.* Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*, 2001, 269(1-2): 131-140.
- 10 Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(3): 181-189.
- 11 Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, *et al.* Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 1999, 401(6748): 79-82.
- 12 Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 245-313.
- 13 Liu PG, He SQ, Zhang YH, *et al.* Protective effects of apocynin and allopurinol on ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(18): 2832-2837.
- 14 Barnes MA, McMullen MR, Roychowdhury S, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor contributes to ethanol-induced liver injury by mediating cell injury, steatohepatitis, and steatosis. *Hepatology*, 2013, 57(5): 1980-1991.
- 15 Windyga J, Stefanska-Windyga E, Odnoczek E, *et al.* Activated prothrombin complex concentrate in combination with tranexamic acid: a single centre experience for the treatment of mucosal bleeding and dental extraction in haemophilia patients with inhibitors. *Haemophilia*, 2016, 22(5): e465-e468.
- 16 Whitmore LC, Goss KL, Newell EA, *et al.* NOX2 protects against progressive lung injury and multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(1): L71-L82.
- 17 Jaffray C, Yang J, Carter G, *et al.* Pancreatic elastase activates

- pulmonary nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery*, 2000, 128(2): 225-231.
- 18 Lv W, Lv C, Yu S, *et al.* Lipoxin A4 attenuation of endothelial inflammation response mimicking pancreatitis-induced lung injury. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013, 238(12): 1388-1395.
- 19 Dasari MS, Richards KM, Alt ML, *et al.* Synthesis of diapocynin. *J Chem Educ*, 2008, 85(3): 411-412.
- 20 Yubero S, Ramudo L, Manso MA, *et al.* Mechanisms of dexamethasone-mediated chemokine down-regulation in mild and severe acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(12): 1205-1211.
- 21 Kim C, Sano Y, Todorova K, *et al.* The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. *Nat Immunol*, 2008, 9(9): 1019-1027.
- 22 Deng W, Abliz A, Xu S, *et al.* Severity of pancreatitis-associated intestinal mucosal barrier injury is reduced following treatment with the NADPH oxidase inhibitor apocynin. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3525-3534.
- 23 Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chem Rev*, 2016, 116(5): 3029-3085.
- 24 Kim JM, Kim HK, Im YN, *et al.* FcγR/ROS/CK2α is the key inducer of NF-κB activation in a murine model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 2018, 175(1-2): 16-25.
- 25 Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol*, 2014, 5: 316.

收稿日期: 2018-04-04 修回日期: 2018-06-22

本文编辑: 蒲素清