

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.29.015

# 硫化氢通过 PI3K/AKT-NF- $\kappa$ B 通路调节重症急性胰腺炎

饶春燕<sup>1</sup>, 胡昌伦<sup>2</sup>, 付兰英<sup>3</sup>, 赵晓晏<sup>1△</sup>

(1. 第三军医大学新桥医院消化内科, 重庆 400037; 2. 武警重庆总队医院内分泌科, 重庆 400061; 3. 重庆市中医院脾胃科 400021)

**摘要:**目的 探讨硫化氢(H<sub>2</sub>S)在重症急性胰腺炎(SAP)中的作用及机制。方法 SD大鼠分为对照组(n=6)、SAP组(n=10)、炔丙基甘氨酸(PAG)+SAP组(n=10)、5 mg/kg NaHS+SAP组(n=10)、10 mg/kg NaHS+SAP组(n=10)、20 mg/kg NaHS+SAP组(n=10)、100 mg/kg NaHS+SAP组(n=10)、wortmannin(以下简写W)+SAP组(n=10)、5 mg/kg NaHS+W+SAP组(n=10)及100 mg/kg NaHS+W+SAP组(n=10),腹腔内注射6%左旋精氨酸制作SD大鼠SAP模型,24 h后处死大鼠。ELISA法检测血浆IL-6水平、胰腺髓过氧化物酶(MPO)活性,Western blot法检测各组大鼠胰腺磷酸化丝/苏氨酸蛋白激酶(p-AKT)及核因子抑制蛋白- $\kappa$ B(I $\kappa$ B $\alpha$ )表达水平,EMSA法检测核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)活性。结果 SAP组和PAG+SAP组血浆IL-6水平、胰腺组织MPO活性及p-AKT水平较对照组明显升高(P<0.05),NF- $\kappa$ B活性也得到增强,且PAG+SAP组高于SAP组(P<0.05);而SAP组和PAG+SAP组I $\kappa$ B $\alpha$ 水平较对照组明显降低(P<0.05),且PAG+SAP组低于SAP组(P<0.05)。给予不同剂量NaHS后,各组血浆IL-6水平、胰腺组织MPO活性、p-AKT水平及NF- $\kappa$ B活性随着NaHS浓度升高而逐渐降低;I $\kappa$ B $\alpha$ 水平却逐渐升高。给予W后,各组血浆IL-6、胰腺MPO活性及p-AKT水平均明显降低,NF- $\kappa$ B活性有一定程度的减弱,而I $\kappa$ B $\alpha$ 表达水平明显升高。结论 外源性H<sub>2</sub>S可减轻SAP的炎症程度,且该作用在一定范围内与血浆H<sub>2</sub>S水平呈正比。H<sub>2</sub>S通过介导PI3K/AKT-NF- $\kappa$ B通路能减轻SAP胰腺损伤的炎症程度。

**关键词:** 硫化氢; 硫化氢钠; 胰腺炎; 急性病; 磷酸化丝/苏氨酸蛋白激酶; 核因子抑制蛋白- $\kappa$ B; 核转录因子  $\kappa$

中图分类号: R31

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)29-3890-05

## H<sub>2</sub>S regulates severe acute pancreatitis through PI3K/AKT-NF- $\kappa$ B pathway

Rao Chunyan<sup>1</sup>, Hu Changlun<sup>2</sup>, Fu Lanying<sup>3</sup>, Zhao Xiaoyan<sup>1△</sup>

(1. Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;

2. Department of Endocrinology, Chongqing Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Chongqing 400061,

China; 3. Department of Gastroenterology, Traditional Chinese Medical Hospital of Chongqing, Chongqing 400021, China)

**Abstract:** Objective To explore the role and mechanism of H<sub>2</sub>S in severe acute pancreatitis. Methods SD rats were randomly assigned into several experimental groups: control group(n=6), SAP group(n=10), PAG+SAP group(n=10), 5 mg/kg NaHS+SAP group(n=10), 10 mg/kg NaHS+SAP group(n=10), 20 mg/kg NaHS+SAP group(n=10), 100 mg/kg NaHS+SAP group(n=10), wortmannin(W)+SAP group(n=10), 5 mg/kg NaHS+W+SAP group(n=10) and 100 mg/kg NaHS+W+SAP group(n=10). These rats were intra-peritoneal injected L-Arginine to get SAP model, and sacrificed at 24 h hour after the first injection. Plasma IL-6 and MPO activity in pancreas were determined by ELISA. Expression of p-AKT and I $\kappa$ B $\alpha$  in pancreas were detected by Western blot, and NF- $\kappa$ B activity was assessed with EMSA. Results SAP and PAG+SAP resulted in a significant increasing in plasma IL-6, MPO activity and expression of p-AKT in pancreas, when compared with the control group(P<0.05), and NF- $\kappa$ B activity also increased, and NF- $\kappa$ B activity in PAG+SAP group was more significant(P<0.05); however, I $\kappa$ B $\alpha$  expression in SAP and PAG+SAP down-regulated obviously, when compared with the control group(P<0.05), and the expression in PAG+SAP group was significantly lower(P<0.05). Different dosage of NaHS reduced that the level of plasma IL-6, MPO activity, expression of p-AKT and NF- $\kappa$ B activity in pancreas changed in different degrees, yet I $\kappa$ B $\alpha$  expression in these groups increased gradually. When compared with the SAP group, 5 mg/kg NaHS+SAP and 100 mg/kg NaHS+SAP, plasma IL-6, MPO activity and expression of p-AKT in pancreas significantly depressed after given wortmannin, besides NF- $\kappa$ B activity also down-regulated; nevertheless I $\kappa$ B $\alpha$  expression up-regulated. Conclusion H<sub>2</sub>S in precondition induced the development of an anti-inflammatory activity in SAP, and in proportion with the concentration of H<sub>2</sub>S in blood in a degree. H<sub>2</sub>S regulated the degree of SAP injury via PI3K/AKT-NF- $\kappa$ B pathway.

**Key words:** H<sub>2</sub>S; NaHS; pancreatitis; acute disease; p-AKT; I $\kappa$ B $\alpha$ ; NF- $\kappa$ B

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是伴随着胰周或全身性炎症,并可发展为多器官功能障碍综合征(multi-organ dysfunction syndrome, MODS)的胰腺炎症过程,病死率高达20%~60%<sup>[1]</sup>。其发病机制复杂,胰酶、氧化损伤、炎症

介质等均参与其中。目前认为SAP发生时各种促炎细胞因子是导致全身炎症反应综合征(systemic inflammation response syndrome, SIRS)发生的关键因素,而SIRS是造成MODS的重要原因。如何才能有效调节细胞因子的产生和相互作用,阻断

作者简介:饶春燕(1985-),住院医师,硕士,主要从事重症急性胰腺炎机制及临床治疗研究。△ 通讯作者, E-mail: zhaoox@medmail.com.cn.

SIRS 和 MODS 的发生,对于防止急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)发展为 SAP 具有重要的意义。

硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)被认为是继 CO、NO 后的第 3 种新型气体分子, H<sub>2</sub>S 主要以 L-半胱氨酸为底物通过激活 5'-磷酸吡哆醛依赖性酶:胱硫醚-γ 裂解酶(cystathionine γ-lyase, CSE, EC 4.4.1.1)和胱硫醚-β 合成酶(cystathionine β-synthase, CBS, EC 4.2.1.22)而生成<sup>[2]</sup>;同时,还可以以 α 酮戊二酸为底物通过 3-巯基丙酮酸盐硫转移酶(3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3MTS)而产生<sup>[3]</sup>。H<sub>2</sub>S 在体内可能有 2 种存在形式:1/3 以气体 H<sub>2</sub>S 形式存在, 2/3 以 NaHS (HS-)形式存在。大多数 CBS 存在于中枢神经系统中,而外周组织中 CSE 活性较高。已有大量研究证实 H<sub>2</sub>S 调节血管、胃肠道、心肌收缩,神经传递和胰岛素分泌<sup>[4-5]</sup>等方面起着重要的作用。近年来,学者们也开始通过多种不同的炎症模型来研究 H<sub>2</sub>S 在炎症过程中的意义,但结果不一。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 96 只 6 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心,体质量 202~243 g。左旋精氨酸(中国上海生物有限公司), wortmannin(以下简称 W)、考马斯亮蓝 G-250、溴酚蓝(美国 Sigma 公司),髓过氧化物酶测试盒(中国南京建成生物有限公司), IL-6 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司),兔抗大鼠 p-AKT 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(美国 Santa 公司),兔抗大鼠 IκBα 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(英国 Abcam 公司),小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体、辣根标记的山羊抗小鼠 IgG 为美国 ProMab 公司产品, BCA 蛋白浓度检测试剂盒、EMSA 检测试剂盒(美国 Pierce 公司), 甲基磺酰脲(PMSF)(美国 Sigma 公司),核蛋白提取试剂盒(中国南京凯基生物科技有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 大鼠模型构建及分组** 构建模型前用普通饲料适应性喂养 SD 大鼠 5 d, 术前 12 h 禁食不禁水。大鼠分为对照组( $n=6$ )、SAP 组( $n=10$ )、PAG+SAP 组( $n=10$ )、5 mg/kg NaHS+SAP 组( $n=10$ )、10 mg/kg NaHS+SAP 组( $n=10$ )、20 mg/kg NaHS+SAP 组( $n=10$ )、100 mg/kg NaHS+SAP 组( $n=10$ )、W+SAP 组( $n=10$ )、5 mg/kg NaHS+W+SAP 组( $n=10$ )和 100 mg/kg NaHS+W+SAP 组( $n=10$ )。参照赖铭裕等<sup>[6]</sup>的方法建立 SAP 模型。SAP 组及干预组均采用经腹腔注射 6%左旋精氨酸溶液诱导模型; PAG 组建模前 1 h 经腹腔注射 PAG 50 mg/kg; 各 NaHS 组建模前 1 h 经腹腔分别注射 NaHS 5、10、20、100 mg/kg<sup>[7]</sup>; 各组注射左旋精氨酸前 0.5 h 大鼠腹腔注射 1.4 mg/kg<sup>[8]</sup>。对照组以生理盐水代替左旋精氨酸。各组大鼠注射后禁食,自由饮水。

**1.2.2 标本采集及处理** 建模 24 h 后,用 2%戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠, 剖右心血离心后检测 IL-6; 钝性分离胰腺后立即冻存于液氮内,以备胰腺髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性、胰腺磷酸化丝/苏氨酸蛋白激酶(p-AKT)、核因子抑制蛋白-κB(IκBα)表达水平和核转录因子-κB(NF-κB)活性检测。

**1.2.3 ELISA 法测定血浆 IL-6** 按照试剂盒说明书检测血浆 IL-6 水平。

**1.2.4 胰腺组织 MPO 活性检测** 将液氮冻存胰腺组织剪成小块,称质量,加入 9 倍质量的生理盐水于 Dounce 匀浆机匀浆,制成 10%胰腺组织匀浆,按照 MPO 检测试剂盒说明书步骤检测 MPO 活性。

## 1.2.5 Western blot 法检测胰腺组织 p-AKT、IκBα 表达水平

胰腺组织加入 RIPA 缓冲液和 PMSF 后组织匀浆, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定总蛋白量。每孔加样 20 μg 蛋白, 加入等量上样缓冲液, 混匀, 煮沸 3 min 使蛋白变性, 上样于 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 电泳完毕后, 电转法将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜, 并用新鲜配制的含 3% 脱脂奶粉的 PBS 液封闭过夜, 然后加入 p-AKT 单克隆抗体(1:300)、IκBα 单克隆抗体(1:500)及抗 GAPDH 抗体(1:8 000), 4℃ 过夜。将膜取出后用 PBS 冲洗 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育, 最后用化学发光法显影, 凝胶成像仪扫描图像。

**1.2.6 EMSA 法检测胰腺组织 NF-κB 活性** 按核蛋白提取试剂盒说明书提取胰腺核蛋白。采用生物素 3' 末端标记法将选取核苷酸序列为 5'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-3', 3'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-5' (湖南远泰生物有限公司合成)。将 8 μg 核蛋白与 20 fm 生物素标记的探针充分结合, 上样于 5% PAGE 电泳后, 转移至带正电荷的尼龙膜上, 紫外线交联 15 min, 封闭 15 min 后与结合液孵育, 用化学发光法显影, 凝胶成像仪扫描图像。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 进行单因素方差分析和 LSD-*q* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

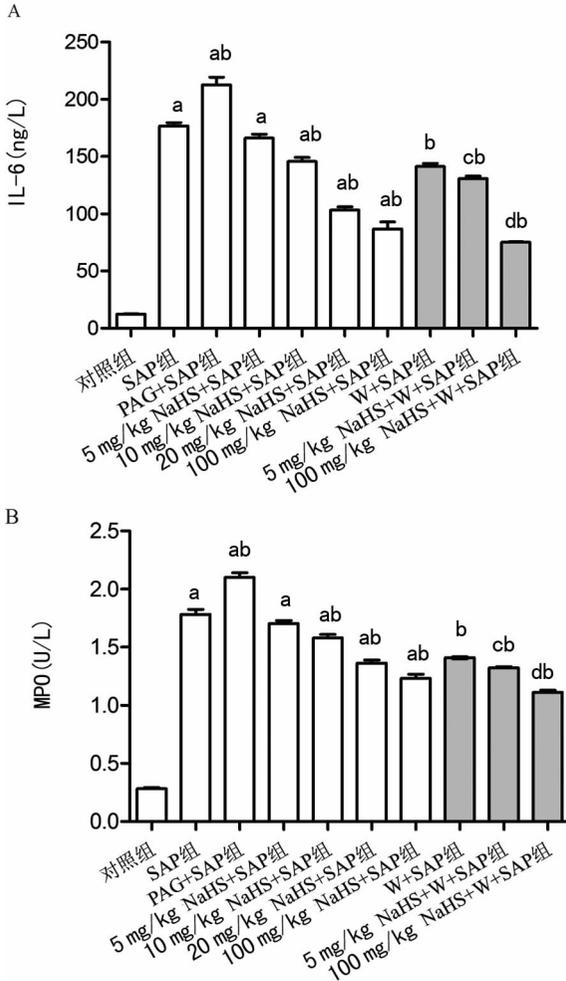
## 2 结果

**2.1 各组大鼠血浆 IL-6 水平** SAP 组和 PAG+SAP 组血浆 IL-6 水平较对照组明显升高( $P < 0.05$ ), 且 PAG+SAP 组高于 SAP 组( $P < 0.05$ ); 不同剂量 NaHS+SAP 组血浆 IL-6 水平随着 NaHS 浓度升高逐渐降低, 其中 5 mg/kg NaHS+SAP 组与 SAP 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 10 mg/kg NaHS+SAP、20 mg/kg NaHS+SAP、100 mg/kg NaHS+SAP 组均低于 SAP 组( $P < 0.05$ ), 但仍高于对照组( $P < 0.05$ ); 给予 W 后, W+SAP 组较 SAP 组大鼠血浆 IL-6 水平明显降低( $P < 0.05$ ); 5 mg/kg NaHS+W+SAP 组与 5 mg/kg NaHS+SAP 组相比, 血浆 IL-6 水平明显降低( $P < 0.05$ ), 100 mg/kg NaHS+W+SAP 组较 100 mg/kg NaHS+SAP 组血浆 IL-6 水平也有明显下降( $P < 0.05$ ), 见图 1A、表 1。

**2.2 各组大鼠胰腺 MPO 活性** SAP 组和 PAG+SAP 组胰腺 MPO 活性较对照组明显升高( $P < 0.05$ ), 且 PAG+SAP 组高于 SAP 组( $P < 0.05$ ); 不同剂量 NaHS 组胰腺 MPO 活性随着 NaHS 浓度升高逐渐降低, 其中 5 mg/kg NaHS+SAP 组与 SAP 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 10 mg/kg NaHS+SAP、20 mg/kg NaHS+SAP、100 mg/kg NaHS+SAP 组均低于 ANP 组( $P < 0.05$ ), 但仍高于对照组( $P < 0.05$ ); 与 SAP 组比较, W+SAP 组大鼠胰腺 MPO 活性明显降低( $P < 0.05$ ); 与 5 mg/kg NaHS+SAP 组和 100 mg/kg NaHS+SAP 组比较, 给予 W 后胰腺 MPO 活性均有明显降低( $P < 0.05$ ), 见图 1A、表 1。

**2.3 大鼠胰腺 p-AKT 蛋白表达** 与对照组( $55.741 \pm 0.786$ )比较, SAP 组( $154.230 \pm 1.719$ )和 PAG+SAP 组( $181.950 \pm 2.372$ ) p-AKT 表达明显增强( $P < 0.05$ ), 且后者较前者更高( $P < 0.05$ ); 给予不同剂量 NaHS 后, p-AKT 表达逐渐减弱, 且各组均低于对照组( $P < 0.05$ ), 高于 SAP 组( $P < 0.05$ ); 给予 W 后, W+SAP 组( $121.543 \pm 1.198$ )、5 mg/kg NaHS+W+SAP 组( $94.587 \pm 0.921$ )及 100 mg/kg NaHS+W+SAP 组( $60.149 \pm 0.812$ )分别与 SAP 组( $154.230 \pm 1.719$ )、5 mg/kg

NaHS +SAP 组 (129. 710±1. 241) 和 100 mg/kg NaHS +SAP 组 (67. 149±0. 767) 比较, p-AKT 蛋白表达均有明显减弱 ( $P<0.05$ ), 见图 2A。



A: 各组 IL-6 水平; B: 各组 MPO 活性; <sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与 SAP 组比较; <sup>c</sup>:  $P<0.05$ , 与 5 mg/kg NaHS+SAP 组比较; <sup>d</sup>:  $P<0.05$ , 与 100 mg/kg NaHS+SAP 组比较。

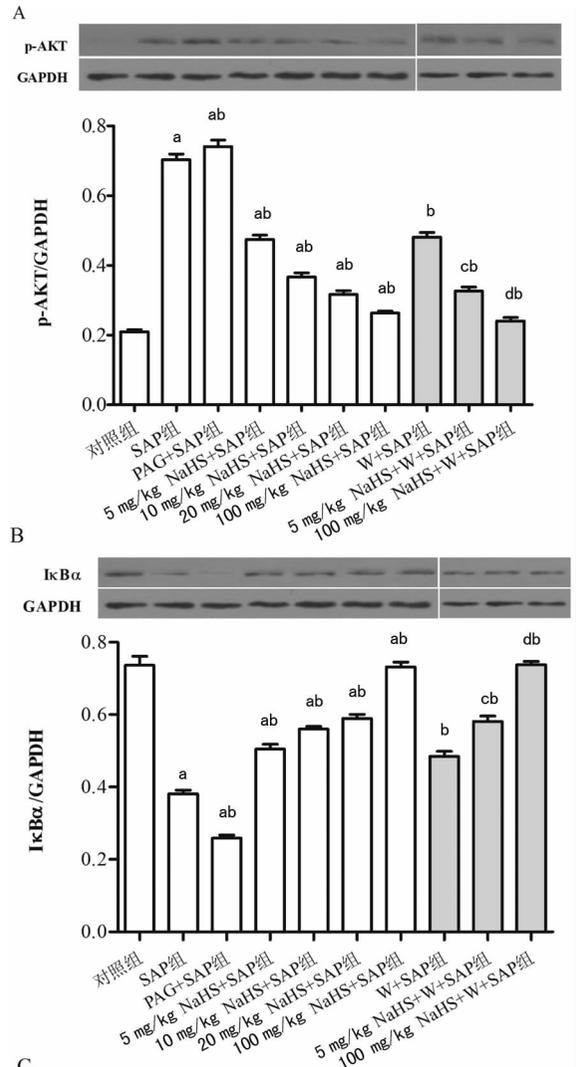
图 1 各组大鼠血浆 IL-6 水平和 MPO 活性分析图

表 1 各组大鼠血浆 IL-6 水平、胰腺 MPO 活性 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	IL-6(ng/L)	胰腺 MPO(U/L)
对照组	12.45±0.60	0.28±0.02
SAP 组	176.76±9.30	1.78±0.07
PAG+SAP 组	212.66±10.20	2.10±0.12
5 mg/kg NaHS+SAP 组	166.16±9.50	1.70±0.08
10 mg/kg NaHS+SAP 组	145.72±8.70	1.58±0.09
20 mg/kg NaHS+SAP 组	103.32±6.90	1.36±0.08
100 mg/kg NaHS+SAP 组	145.72±8.70	1.58±0.09
W+SAP 组	141.36±6.9	1.41±0.07
5 mg/kg NaHS+W+SAP 组	130.88±4.20	1.32±0.05
100 mg/kg NaHS+W+SAP 组	75.10±2.80	1.11±0.03

**2.4 各组大鼠胰腺 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达** 与对照组 (195.350±2.320) 比较, SAP 组 (90.671±1.217) 和 PAG+SAP 组 (63.065±0.679) I $\kappa$ B $\alpha$  表达明显减弱 ( $P<0.05$ ), 且后者较前者更低 ( $P<0.05$ ); 给予不同剂量 NaHS 后, I $\kappa$ B $\alpha$  表达逐渐增强, 且各组均低于对照组 ( $P<0.05$ ), 高于 SAP 组 ( $P<0.05$ ); 给予 W 后, W+SAP 组 (115.900±1.314)、5 mg/kg NaHS+

W+SAP 组 (158.710±1.697) 及 100 mg/kg NaHS+W+SAP 组 (174.950±1.879) 分别与 SAP 组 (90.671±1.217)、5 mg/kg NaHS+SAP 组 (146.000±1.676) 和 100 mg/kg NaHS+SAP 组 (161.460±1.743) 相比, I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达均有明显减弱 ( $P<0.05$ ), 见图 2B。



A: 各 p-AKT 蛋白表达; B: I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达; C: 各组 NF- $\kappa$ B 活性检测; <sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与 SAP 组比较; <sup>c</sup>:  $P<0.05$ , 与 5 mg/kg NaHS+SAP 组比较; <sup>d</sup>:  $P<0.05$ , 与 100 mg/kg NaHS+SAP 组比较。

图 2 各组大鼠胰腺 p-AKT、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达及灰度比、NF- $\kappa$ B 活性

**2.5 各组大鼠胰腺 NF- $\kappa$ B 活性** 与对照组相比, SAP 组和 PAG+SAP 组 NF- $\kappa$ B 活性明显增强, 给予 NaHS 后, NF- $\kappa$ B 活性逐渐减弱; 给予 W 后, W+SAP 组、5 mg/kg NaHS+W+SAP 组及 100 mg/kg NaHS+W+SAP 组分别与 SAP 组、5 mg/kg NaHS+SAP 组和 100 mg/kg NaHS+SAP 组比较, NF- $\kappa$ B 活性均有不同程度减弱, 图 2C。

**3 讨论**

近来有研究显示, H<sub>2</sub>S 通过介导 AKT 激活从而提高心动

指数和减少心肌梗死面积,同时使用 LY294002 抑制 AKT 则会消除 H<sub>2</sub>S 产生的这种心脏保护作用<sup>[9]</sup>。Ramamamy 等<sup>[10]</sup>也认为 H<sub>2</sub>S 在雨蛙肽处理的胰腺腺泡细胞中通过 PI3K/AKT 通路起着抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子的产生,并且该作用不会引起 p38、Jun、MAPK 磷酸化。这与本实验结果相符,认为 H<sub>2</sub>S 可以通过 PI3K/AKT 通路在炎症反应中起到抑制作用。

NF- $\kappa$ B 是一种广泛存在与细胞中易被诱导的核转录因子,它是参与调节细胞生长、免疫应答、炎症反应和凋亡等信号通路的关键细胞因子<sup>[11]</sup>。PI3K/AKT 是调节 NF- $\kappa$ B 及下游依赖基因表达的重要介质,而大量研究证实 AP 的发生、发展有赖于 NF- $\kappa$ B 转录,它在调节炎症介质及基因表达中起着重要作用<sup>[12-13]</sup>。更有研究证实,人单核细胞中,NF- $\kappa$ B 转录是外源性 H<sub>2</sub>S 导致细胞因子表达的核心部分<sup>[14]</sup>。本研究发现 H<sub>2</sub>S 在 SAP 大鼠模型中的调节作用与抑制 I $\kappa$ B $\alpha$  降解,并下调 NF- $\kappa$ B 及转录相关的促炎基因表达有关;并且,给予 PI3K 抑制剂 W 后,NF- $\kappa$ B 进一步下降,血浆 IL-6 水平及胰腺 MPO 活性也明显降低。TNF- $\alpha$  处理的人脐静脉内皮细胞<sup>[15]</sup>、LPS 处理的星状细胞<sup>[16]</sup>等体外细胞培养中,NaHS 可以通过抑制 I $\kappa$ B $\alpha$  降解和 NF- $\kappa$ B 核转位而产生保护性作用。在静脉注射 NaHS 能够抑制 NO 和超氧化物的产生,从而在失血性休克复苏再灌注早期时维持平均动脉压,下调 NF- $\kappa$ B 活性剂 iNOS 和 ICAM-1 水平<sup>[17]</sup>。

AKT 是 PI3K 调节的主要效应因子,它的激活有赖于依赖磷酸肌醇的激酶(PDK-1)使 Thr308 和 Ser473 发生磷酸化<sup>[17]</sup>。一旦 AKT 被激活,即可产生广泛的作用调节细胞存活、增殖和生长<sup>[17]</sup>。虽然 AKT 不是由 PI3K 直接激活磷酸化的,但是其下游调控的信号转导是严格按照 PI3K 的活性来调节的。H<sub>2</sub>S 能使培养的内皮细胞<sup>[18]</sup>、结肠癌细胞<sup>[19]</sup>、雨蛙肽处理的胰腺腺泡细胞<sup>[10]</sup>及大鼠下肢缺血肌肉<sup>[20]</sup>中的 AKT 活化,并且在局部缺血心肌组织中给予少量 NaHS 即可引起 AKT 活化,从而减轻心肌损伤<sup>[21]</sup>。本实验也认为外源性 H<sub>2</sub>S (NaHS)能够通过 AKT 作用于炎症因子,但不同的是,本实验中 H<sub>2</sub>S 是通过抑制 AKT 磷酸化,从而下调炎症因子的表达。之前的研究认为激活 PI3K/AKT 通路能产生抗炎作用,这与作者的观点一致<sup>[22-23]</sup>。在本实验先给予外源性 H<sub>2</sub>S,0.5 h 后再给予 W,二者起到了加强的作用,说明 H<sub>2</sub>S 可能是通过 PI3K 下游的某因子来调节 AKT 活性的,但是其具体机制还需要进一步研究证实。

迄今为止,不少学者通过局部水肿、胰腺炎、败血症等多种动物模型和细胞培养研究认为 H<sub>2</sub>S 在体内具有促炎作用。外源性 H<sub>2</sub>S (NaHS 或 Na<sub>2</sub>S)能使血浆、组织中炎症因子和趋化因子表达增加,而给予 PAG 后能逆转 H<sub>2</sub>S 的促炎作用<sup>[24-28]</sup>。H<sub>2</sub>S 的促炎作用可以通过 pSFKs-NF- $\kappa$ B<sup>[26]</sup>及 ERK-NF- $\kappa$ B 通路<sup>[29]</sup>调节炎症反应。在动物模型中,NaHS 作用于 IFN- $\gamma$  处理的人单核细胞系 U937 后也能通过激活活化 NF- $\kappa$ Bp65 上调炎症因子<sup>[30]</sup>。但是在本实验中,给予 NaHS 后,能够降低 ANP 时血浆 IL-6 水平,胰腺 MPO 活性。证明 H<sub>2</sub>S 在大鼠精氨酸诱导的 ANP 模型中产生抗炎作用。研究发现治疗性给予 H<sub>2</sub>S 能通过抑制促炎因子 IL-6 产生,增加抗炎因子 IL-10 水平,改善肺组织蛋白质氧化作用,从而减轻急性吸入性肺损伤程度<sup>[31]</sup>。上述研究充分显示出 H<sub>2</sub>S 在多种炎症过程中能发挥一定的抗炎作用,与本实验结果相符。

本实验中不仅发现 H<sub>2</sub>S 对 SAP 有一定的抗炎作用,而且认为抗炎作用在 NaHS 50~100 mg/kg 范围内会随着 H<sub>2</sub>S 浓

度的升高而逐渐增强,但不知道 H<sub>2</sub>S 的作用是否会随着浓度的升高不断加强。然而,Sidhapuriwala 等<sup>[32]</sup>通过雨蛙肽诱导的 AP 模型发现,给予 10 mg/kg NaHS 能降低血淀粉酶水平、胰腺及肺组织 MPO 活性及血浆中炎症趋化因子(CCL2、CCL3、CXCL1)和黏附分子(E 选择素、P 选择素、ICAM-1、VCAM-1)表达,而给予 5 mg/kg NaHS 不会对胰腺及肺损伤产生明显的作用,同时,15 mg/kg NaHS 并不会使 NaHS 的抗炎作用增强。预先给予胰腺腺泡细胞 5  $\mu$ mol/L NaHS 后再用雨蛙肽处理,研究者发现 I $\kappa$ B $\alpha$  降解减少,NF- $\kappa$ B 活性降低,炎症因子减少;而给予 10  $\mu$ mol/L 和 20  $\mu$ mol/L NaHS 时,该作用并未得到加强,甚至未见 NaHS 产生明显的作用<sup>[10]</sup>。吸入 1 ppmol 或 5 ppmol H<sub>2</sub>S 并不会减轻呼吸机肺损伤,但是吸入 60 ppmol H<sub>2</sub>S 时却能加速呼吸机肺损伤的炎症反应<sup>[33]</sup>。甚至,在缺血再灌注模型中,给予不同剂量、不同浓度的 NaHS,其对模型作用会出现剂量依赖性的 U 型改变<sup>[34-35]</sup>。之所以会出现这种情况,可能与 H<sub>2</sub>S 直接释放的多少有关系。但具体机制如何,仍有待进一步研究。

本研究认为内源性 H<sub>2</sub>S 的减少参与了 SAP 的病理生理过程;给予一定量的外源性 H<sub>2</sub>S (NaHS)可通过抑制 AKT 磷酸化,进而使 I $\kappa$ B $\alpha$  降解减少,NF- $\kappa$ B 转录活性降低,使血浆 IL-6 水平下调,胰腺损伤程度减轻,对 ANP 炎症反应有一定的抑制作用;并且在一定范围内,H<sub>2</sub>S 抑制 SAP 炎症反应的作用随着其浓度的升高而逐渐增强。虽然目前的研究尚不能对 H<sub>2</sub>S 在炎症过程中的作用定论,但是这已经充分显示出 H<sub>2</sub>S 的重要作用,也为今后治疗 SAP 提供了一条新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Al Mofleh IA. Severe acute pancreatitis: Pathogenetic aspects and prognostic factors[J]. World J Gastroenterol, 2008,14(5):675-684.
- [2] Moore PK, Bhatia M, Mochhala S. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? [J]. Trends Pharmacol Sci, 2003,24(12):609-611.
- [3] Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, et al. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces Hydrogen sulfide and bound sulfane Sulfur in the brain[J]. Antioxid Redox Signal, 2009,11(4):703-714.
- [4] Bhatia M. Hydrogen sulfide as a vasodilator[J]. IUBMB Life, 2005,57(9):603-606.
- [5] 张宁,王于理,郑勇,等. 内源性硫化氢在不同时期大鼠肝硬化中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009,17(3):307-311.
- [6] 赖铭裕,梁志海,唐国都,等. 腹腔注射左旋精氨酸诱导急性坏死性胰腺炎大鼠模型[J]. 世界华人消化杂志, 2006,14(22):2233-2236.
- [7] Sidhapuriwala JN, Ng SW, Bhatia M. Effects of hydrogen sulfide on inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis[J]. J Inflamm (Lond), 2009,6:35.
- [8] Singh VP, Saluja AK, Bhagat L, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of trypsinogen modulates the severity of acute pancreatitis[J]. J Clin Invest, 2001,108(9):1387-1395.
- [9] Yong QC, Lee SW, Foo CS, et al. Endogenous Hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ische-

- mic postconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(3): H1330-H1340.
- [10] Ramasamy T, Jia S, Yung-Hua K, et al. Effect of Hydrogen sulfide on the phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B pathway and on caerulein-induced cytokine production in isolated mouse pancreatic acinar cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329(3): 1166-1177.
- [11] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling[J]. *Cell*, 2008, 132(3): 344-362.
- [12] Lee M, Schwab C, Yu S, et al. Astrocytes produce the anti-inflammatory and neuroprotective agent Hydrogen sulfide[J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(10): 1523-1534.
- [13] Ganster F, Burban M, De La Bourdonnaye M, et al. Effects of Hydrogen sulfide on hemodynamics, inflammatory response and oxidative stress during resuscitated hemorrhagic shock in rats[J]. *Crit Care*, 2010, 14(5): R165.
- [14] Cai WJ, Wang MJ, Moore PK, et al. The novel proangiogenic effect of Hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 76(1): 29-40.
- [15] Cai WJ, Wang MJ, Ju LH, et al. Hydrogen sulfide induces human colon cancer cell proliferation: role of Akt, ERK and p21[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34(6): 565-572.
- [16] Wang MJ, Cai WJ, Li N, et al. The Hydrogen sulfide donor NaHS promotes angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(9): 1065-1077.
- [17] Yong QC, Lee SW, Foo CS, et al. Endogenous Hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(3): H1330-1340.
- [18] Luyendyk JP, Schabbauser GA, Tencati MA, et al. Genetic analysis of the role of the PI3K-Akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages [J]. *J Immunol*, 2008, 180(6): 4218-4226.
- [19] Tarassishin L, Suh HS, Lee SC. Interferon regulatory factor 3 plays an anti-inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8(1): 187.
- [20] Ramasamy Tamizhselvi PK, Bhatia M. Inhibition of Hydrogen sulfide synthesis attenuates chemokine production and protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury[J]. *Pancreas*, 2008, 36(4): e24-31.
- [21] Bhatia M, Sidhapuriwala JN, Ng SW, et al. Pro-inflammatory effects of Hydrogen sulphide on substance P in caerulein-induced acute pancreatitis [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(2): 580-590.
- [22] Tamizhselvi R, Koh YH, Sun J, et al. Hydrogen sulfide induces ICAM-1 expression and neutrophil adhesion to caerulein-treated pancreatic acinar cells through NF-kappa B and Src-family kinases pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(9): 1625-1636.
- [23] Zhang H, Zhi L, Mochhala S, et al. Hydrogen sulfide acts as an inflammatory mediator in cecal ligation and puncture-induced sepsis in mice by upregulating the production of cytokines and chemokines via NF-kappaB[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292(4): L960-L971.
- [24] Zhang H, Zhi L, Mochhala SM, et al. Endogenous Hydrogen sulfide regulates leukocyte trafficking in cecal ligation and puncture-induced sepsis[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82(4): 894-905.
- [25] Zhang H, Mochhala SM, Bhatia M. Endogenous Hydrogen sulfide regulates inflammatory response by activating the ERK pathway in polymicrobial sepsis[J]. *J Immunol*, 2008, 181(6): 4320-4331.
- [26] Zhi L, Ang AD, Zhang H, et al. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via ERK-NF-kappaB pathway[J]. *J Leuk Biol*, 2007, 81(5): 1322-1332.
- [27] Esehie A, Kiss L, Olah G, et al. Protective effect of Hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation[J]. *Clin Sci*, 2008, 115(3): 91-97.
- [28] Kang K, Zhao MY, Jiang HC, et al. Role of Hydrogen sulfide in hepatic Ischemia-Reperfusion-Induced injury in rats[J]. *Liver Transpl*, 2009, 15(10): 1306-1314.
- [29] Li L, Rossoni G, Sparatore A, et al. Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42(5): 706-719.
- [30] Whiteman M, Li L, Rose P, et al. The effect of Hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(10): 1147-1154.
- [31] Fiorucci S, Orlandi S, Mencarelli A, et al. Enhanced activity of a Hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis[J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 150(8): 996-1002.
- [32] Sidhapuriwala JN, Ng SW, Bhatia M. Effects of hydrogen sulfide on inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2009, 6: 35.
- [33] Francis RC, Vaporidi K, Bloch KD, et al. Protective and detrimental effects of Sodium sulfide and Hydrogen sulfide in murine ventilator-induced lung injury[J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(5): 1012-1021.
- [34] Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(39): 15560-15565.
- [35] Ji Y, Pang QF, Xu G, et al. Exogenous Hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 587(1/3): 1-7.