

# 莱菔硫烷对重症急性胰腺炎大鼠肺组织内血红素加氧酶-1 及环氧合酶表达的影响

孔文基(齐齐哈尔医学院附属第三医院药剂科,黑龙江齐齐哈尔 161002)

**【摘要】** 目的 探讨莱菔硫烷对重症急性胰腺炎(SAP)肺组织血红素加氧酶-1(HO-1)及环氧合酶(COX)表达的影响。**方法** 将 72 只大鼠随机分为对照组(N 组)、SAP 模型组(SAP 组)和莱菔硫烷组,每组各 24 只,分别于术后 3、6、12 h 对各组进行肺损伤评分、检测肺组织湿干比(W/D)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、HO-1 mRNA、COX mRNA 的表达量。**结果** SAP 组的各指标均明显高于 N 组( $P < 0.05$ );莱菔硫烷组的病理评分、肺 W/D 值、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、COX-2 mRNA 表达量较 SAP 组明显降低( $P < 0.05$ ),HO-1 mRNA 表达量较 SAP 组明显升高( $P < 0.05$ );相关性分析示 HO-1 mRNA 表达量与 COX-2 mRNA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的表达水平呈明显负相关( $P < 0.05$ )。**结论** 莱菔硫烷增加了 SAP 肺组织中 HO-1 的表达量从而减轻急性肺损伤,这可能与通过抑制 COX 表达有关。

**【关键词】** 重型胰腺炎; 莱菔硫烷; 血红素加氧酶-1; 环氧合酶

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.14.034 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)14-2056-03

**Effects of sulforaphane on expression of HO-1 and COX in lung tissue of severe acute pancreatitis rat** Kong Wen-ji  
(Department of Pharmacy, Third Affiliated Hospital of Qiqihaer Medical College, Qiqihaer, Heilongjiang 161002, China)

**【Abstract】 Objective** To study the effects of sulforaphane on the levels of HO-1 and COX-2 in the lung tissue of severe acute pancreatitis(SAP) rat model. **Methods** Seventy-two rats were randomly divided into three groups: control group(N group),SAP model group(SAP group) and sulforaphane group,24 cases in each group. The lung injury evaluation, wet-to-dry(W/D) ratio,levels of TNF and IL-1 $\beta$  protein and expression of HO-1 and COX-2 mRNA were measured at 3,6,12 h after operation. **Results** Compared with the N group,the levels of every indexes in the SAP group were higher ( $P < 0.05$ ). In the comparison with the SAP group,the pathological scores,W/D ratio,levels of TNF and IL-1 $\beta$  protein and expression of COX-2 mRNA were lower in the sulforaphane group,while expression of HO-1 mRNA was higher( $P < 0.05$ ). The expression amounts of HO-1 mRNA showed the significantly negative correlation with the expression levels of TNF and IL-1 $\beta$  protein and expression of COX-2 mRNA( $P < 0.05$ ). **Conclusion**

Sulforaphane can reduce the lung injury by increasing the expression amount of HO-1 in lung,which may be related with inhibiting the expression of COX.

**【Key words】** severe acute pancreatitis; sulforaphane; HO-1; COX

早期的急性胰腺炎约 15%~30% 发展为重症急性胰腺炎,由于病情发展迅速,不仅表现为胰腺组织局部的缺血坏死,而且常常伴有其他多脏器功能的损害,导致全身炎症反应综合征。其中尤以急性肺损伤或急性呼吸窘迫综合征发病率最高也最严重。炎症反应在重症急性胰腺炎所致的急性肺损伤中发挥了关键的作用,尤其是大量炎症介质的产生,包括肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )<sup>[1]</sup>。环氧合酶 2(COX-2)是前列腺合成的一种重要前炎性介质,相关研究证实了 COX-2 介导了急性胰腺炎及相关肺损伤的炎症反应过程<sup>[2-3]</sup>,但是具体机制尚未完全阐明。血红素加氧酶 1(HO-1)具有抗氧化、抗感染等一系列生物学效应,参与机体的多种病理生理过程,在调控多种急性肺损伤(ALI)炎性介质的基因表达起重要作用<sup>[4]</sup>,莱菔硫烷对多种疾病的损伤具有保护作用,成为各个领域研究的热点和难点。本研究旨在探讨莱菔硫烷 HO-1 重症急性胰腺炎大鼠肺组织内 HO-1 及环氧合酶(COX)的表达及意义。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料来源** 取健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠共 72 只,体质量 220~260 g,由本院动物房提供。术前禁食 12 h,自由

饮水。

**1.2 试剂** 牛黄胆酸钠(Sigma 公司),RT-PCR 试剂盒(深圳晶美生物公司),牛血晶素(B&D 公司),莱菔硫烷(Sulforaphane)购于美国 LKT 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 动物分组和模型制作** 将 72 只 SD 大鼠分为对照组(N 组)、SAP 模型组(SAP 组)、HO-1 莱菔硫烷组(莱菔硫烷组),每组各 24 只。SAP 模型制作,采用传统的 5% 牛黄胆酸钠法建立 SD 大鼠 SAP 模型。实验前 12 h 内禁食,自由饮水。用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后逐层开腹,暴露胰腺和十二指肠。用微量泵逆行胆胰管内匀速内注射 5% 牛黄胆酸钠(1 mL/kg),约 5 min 后当观察到大鼠胰腺组织出现弥漫性出血点时,拔出针头,去除血管夹,连续缝合管壁腹腔。N 组开腹后仅用棉签轻轻反动胰腺和小肠后关腹,不注射牛黄胆酸钠。莱菔硫烷组于造模后 30 min 腹腔注射莱菔硫烷 10 mg/kg。

**1.3.2 检测指标及方法** 各组大鼠分别于术后 3、6、12 h 3 个时间点各取 6 只大鼠,用 10% 的水合氯醛腹腔麻醉,并取组织样本进行检测。

**1.3.2.1 肺组织病理** 开胸取右肺上叶,10% 甲醛溶液固定,

常规石蜡包埋、切片及 HE 染色,光镜下观察肺组织病理学变化并进行评分。

**1.3.2.2 肺湿干重比测定** 取右下肺纱布拭干后称重记为肺湿重(W),随后放于 80 °C 烤箱中,每天称重 1 次,待重量稳定后记为肺干重(D),两者的比值为(W/D)。

**1.3.2.3 肺组织炎症因子的检测** 取左肺液氮速冻组织用于炎症因子(TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ )、HO-1 和 COX-2 的检测。运用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肺组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表达,操作严格按照试剂盒说明进行,HO-1 和 COX-2 的检测采用实时定量荧光聚合酶链反应(RT-qPCR)方法:采用 TRIzol 法提取组织总 RNA,取等量 RNA 进行反转录,HO-1 上游引物为 5'-ATC ATG GCT TGG CCT ACA TTG-3',下游引物为 5'-CAC GGA TGT GCA CCT CCT T-3',扩增产物长度为 107 bp;COX-2 上游引物为 5'-TCA AAA GAA GTG CTG-GAA AAG GTT-3',下游引物为 5'-TCT ACCT-GAG TGT CTT TGA CTG TG-3'(296 bp); $\beta$ -actin 上游引物为 5'-TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA-3',下游引物为 5'-TAG AGC CAC CAA TCC ACA CA-3',扩增产物长度为 300 bp。反转录反应体系 20  $\mu$ L,其中 5 $\times$ M-MLV Buffer 4  $\mu$ L,dNTP Mixture(各 10 mmol/L)1  $\mu$ L,Oligo dT Primer(50  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L,M-MLV RTase(200 U/ $\mu$ L)0.5  $\mu$ L,RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ L)0.5  $\mu$ L,RNase free dH<sub>2</sub>O 9  $\mu$ L,总 RNA 4  $\mu$ L;反应条件为 25 °C $\times$ 10 min,42 °C $\times$ 30 min,95 °C $\times$ 2 min。qPCR 反应体系 20  $\mu$ L,其中 SYBR super-Mix 荧光 10  $\mu$ L,模板混合液(上游、下游引物)1  $\mu$ L,超纯水 5  $\mu$ L,稀释 2 倍 cDNA 4  $\mu$ L;反应步骤为第 1 步:95 °C $\times$ 8.5 min;第 2 步:95 °C $\times$ 15 s,58 °C $\times$ 1 min,循环 45 次。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS19.0 统计软件进行处理,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析和多元相关性分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 各组大鼠肺组织损伤病理学评分** 与 N 组比较,SAP 组肺组织结构破坏,肺泡腔内大量渗出液,间质充血、水肿,炎性细胞明显增多,莱菔硫烷组出血、炎性细胞浸润较 SAP 组明显减轻,各个时间点的肺病理评分结果显示(表 1):SAP 组的病理评分明显高于 N 组,两组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );莱菔硫烷组的病理评分明显低于 SAP 组,两组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.2 各组大鼠肺组织湿干重比变化** 研究结果发现 SAP 组与 N 组相比,肺 W/D 值明显升高,且在各时间点差异均有统计学意义( $P<0.05$ );莱菔硫烷组的肺 W/D 在各个时间点均

低于 SAP 组( $P<0.05$ ),见表 2。

**表 1 不同时间处理组肺组织病理评分( $\bar{x}\pm s$ ,分)**

时间	N 组	SAP 组	莱菔硫烷组
3 h	0.73 $\pm$ 0.04	3.54 $\pm$ 0.97*	2.23 $\pm$ 0.62*#
6 h	0.70 $\pm$ 0.03	4.13 $\pm$ 1.32*	2.45 $\pm$ 0.33*#
12 h	0.72 $\pm$ 0.05	5.97 $\pm$ 1.12*	3.44 $\pm$ 1.02*#

注:与 N 组比较,\* $P<0.05$ ;与 SAP 组比较,# $P<0.05$ 。

**表 2 不同时间处理组肺 W/D 值比较( $\bar{x}\pm s$ )**

时间	N 组	SAP 组	莱菔硫烷组
3 h	4.35 $\pm$ 0.05	5.37 $\pm$ 0.07*	4.92 $\pm$ 0.05*#
6 h	4.38 $\pm$ 0.08	5.43 $\pm$ 0.08*	5.15 $\pm$ 0.13*#
12 h	4.41 $\pm$ 0.09	5.72 $\pm$ 0.12*	5.19 $\pm$ 0.12*#

注:与 N 组比较,\* $P<0.05$ ;与 SAP 组比较,# $P<0.05$ 。

**2.3 各组大鼠炎症因子的表达水平比较** SAP 组大鼠肺组织中的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达量明显高于 N 组( $P<0.05$ ),在 12 h 内呈不断升高趋势。用莱菔硫烷干预处理后在各个时间点莱菔硫烷组的大鼠肺组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的水平较 SAP 组明显下降( $P<0.05$ ),见表 3。

**表 3 不同处理组肺组织炎症因子水平比较( $\bar{x}\pm s$ )**

指标	时间(h)	N 组	SAP 组	莱菔硫烷组
TNF- $\alpha$ (pg/mg)	3	114.5 $\pm$ 8.5	215.7 $\pm$ 9.7*	154.5 $\pm$ 8.5*#
	6	119.8 $\pm$ 7.8	269.3 $\pm$ 11.8*	171.5 $\pm$ 8.3*#
	12	123.1 $\pm$ 8.9	279.2 $\pm$ 6.2*	195.9 $\pm$ 9.2*#
IL-1 $\beta$ (pg/mg)	3	204.5 $\pm$ 9.5	395.7 $\pm$ 11.7*	374.92 $\pm$ 11.5*#
	6	200.8 $\pm$ 9.8	465.3 $\pm$ 10.8*	415.5 $\pm$ 12.3*#
	12	197.1 $\pm$ 9.2	505.2 $\pm$ 11.2*	425.2 $\pm$ 9.2*#

注:与 N 组比较,\* $P<0.05$ ;与 SAP 组比较,# $P<0.05$ 。

**2.4 各组大鼠 HO-1 和 COX-2 mRNA 表达变化** 造模后 SAP 组大鼠肺组织中的 HO-1 mRNA 表达量较对照组升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),予以莱菔硫烷干预后,莱菔硫烷组的 HO-1 mRNA 表达量较 SAP 组明显升高( $P<0.05$ )。SAP 组的 COX-2 mRNA 表达水平较 N 组明显增高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),莱菔硫烷组 COX-2 mRNA 表达量较 SAP 组明显下降( $P<0.05$ ),见表 4。

**表 4 不同处理组大鼠 HO-1 和 COX-2 mRNA 表达量变化( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	造模后 HO-1 mRNA			造模后 COX-2 mRNA		
	3 h	6 h	12 h	3 h	6 h	12 h
N 组	1.64 $\pm$ 0.03	1.54 $\pm$ 0.01	1.46 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.02
SAP 组	4.05 $\pm$ 0.05*	3.46 $\pm$ 0.45*	2.36 $\pm$ 1.25*	3.35 $\pm$ 0.25*	5.78 $\pm$ 0.25*	6.36 $\pm$ 0.64*
莱菔硫烷组	6.89 $\pm$ 0.04*#	12.35 $\pm$ 0.02*#	19.58 $\pm$ 0.74*#	2.89 $\pm$ 0.04*#	1.48 $\pm$ 0.02*#	1.18 $\pm$ 0.74*#

注:与 N 组比较,\* $P<0.05$ ;与 SAP 组比较,# $P<0.05$ 。

**2.5 SAP 肺组织中 HO-1 mRNA 和 COX mRNA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的相关性分析** 通过多元相关性分析发现随着 COX-2 mRNA 表达量的增高,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的水平也明显增高,呈正相关性( $r$  分别为 0.436,0.375, $P<0.05$ );HO-1 mRNA 表达量与

COX-2 mRNA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的表达水平呈明显负相关,差异有统计学意义( $r$  分别为-0.758,-0.425,-0.389, $P<0.05$ )。

**3 讨 论**

急性胰腺炎相关性肺损伤(APALI)发病机制复杂,大量

研究证实了炎症介质和炎症细胞的激活在介导 APALI 过程中发挥了关键的作用,尤其是 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ <sup>[5]</sup>。相关研究提示 COX-2 在炎症反应的过程中发挥了重要作用<sup>[6]</sup>,一方面 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子可以上调 COX-2 的表达,另一方面 COX-2 可进一步加重炎症反应和过氧化反应的发生,在损伤的炎症反应过程中形成了一个恶性循环。目前大量研究表明 COX-2 参与了多种急性肺损伤的发病机制过程,抑制 COX-2 的表达对缺血再灌注肺损伤、机械通气肺损伤、脓毒症肺损伤等均具有一定的保护作用<sup>[7-9]</sup>。Ethridge 等<sup>[10]</sup> 研究证实了破坏 COX-2 相关基因的表达可以减轻急性胰腺炎及 APALI。HO-1 作为内源性的保护蛋白近年来成为研究的热点和难点,而莱菔硫烷相关报道指出其与 HO-1、COX-2 具有一定的相关性,但其在 APALI 中的具体作用机制尚未完全阐明,本研究主要探讨了莱菔硫烷对 APALI 的 HO-1 与 COX-2 炎症反应的相关性。

本文研究结果显示,造模后 SAP 组大鼠肺组织的湿干比、肺病理损伤评分及炎症因子的表达水平均较对照组明显升高,表明了 APALI 过程伴随肺水肿、肺损伤程度的加重,且 SAP 诱导了 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达水平的明显升高。值得注意的是 SAP 组的 HO-1 mRNA 表达量较正常对照也明显增高,为了进一步证实莱菔硫烷在 APALI 中的作用,本研究予以莱菔硫烷干预,结果肺组织中 HO-1 mRNA 的表达量较 SAP 组明显升高,同时伴随 COX-2 mRNA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达量的下降,呈负相关,肺水肿、肺组织病理莱菔硫烷干预组也较 SAP 组明显好转。因此,本研究证实了莱菔硫烷诱导的 HO-1 表达的升高对 APALI 起到一定的保护作用。应用莱菔硫烷上调 HO-1 的表达有可能成为治疗 APALI 的新思路和方法。莱菔硫烷是一种可以食用的异硫氰酸盐,主要存在于花菜、西兰花以及甘蓝等十字花科植物中,日常食用西兰花(200 mg/d)可以有效地减少自发性高血压大鼠的高血压水平,炎症反应及氧化应激损伤。相关报道指出莱菔硫烷可以诱导多种组织细胞 HO-1 的表达,而 HO-1 除了分解血红素外,其代谢产物 CO 和胆绿素等在体内具有重要的生物学效应,包括抗氧化、抑制炎症反应等,激活 HO-1 相关的信号通路,促进 HO-1 的表达对多种肺损伤具有保护作用<sup>[11-12]</sup>。目前 HO-1 和 COX-2 之间的具体作用机制尚未完全明确,有研究表明 HO-1 有可能是通过 MAPKs 和 Nrf2/XIANG 相关的信号通路来抑制 COX-2 的表达<sup>[13]</sup>,HO-1 也可通过促进抗炎因子的表达来减轻炎症反应,例如 IL-10,这样莱菔硫烷可能通过调控 HO-1 与 COX-2 通路起到减轻肺组织损伤的作用。

综上所述,本研究结果证实了莱菔硫烷可上调 HO-1 的表达量,而 HO-1 可能通过抑制 COX-2、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达而对 APALI 起到一定的保护作用,为临床治疗 APALI 提供了新的靶点和治疗思路,值得进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Bhatia M, Brady M, Shokuchi S, et al. Inflammatory mediators in acute pancreatitis[J]. J pathol, 2000, 190(2): 117-125.
- [2] Silva A, Weber A, Bain M, et al. COX-2 is not required for the development of murine chronic pancreatitis[J]. Am J

Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 300(6): 968-975.

- [3] O'Brien G, Shields CJ, Winter DC, et al. Cyclooxygenase-2 plays a central role in the genesis of pancreatitis and associated lung injury [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005, 4(1): 126-129.
- [4] Willis D, Moore A, Frederick R, et al. Heme oxygenase; a novel target for the modulation of inflammatory response [J]. Nature medicine, 1996, 2(1): 87-93.
- [5] Luan ZG, Zhang J, Yin XH, et al. Ethyl pyruvate significantly inhibits tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and high mobility group box 1 releasing and attenuates sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis associated with acute lung injury [J]. Clin Exp Immunol, 2013, 172(3): 417-426.
- [6] Ali-Fehmi R, Semaan A, Sethi S, et al. Molecular typing of epithelial ovarian carcinomas using inflammatory markers [J]. Cancer, 2011, 117(2): 301-309.
- [7] Ranganathan PV, Jayakumar C, Mohamed R, et al. Netrin-1 regulates the inflammatory response of neutrophils and macrophages, and suppresses ischemic acute kidney injury by inhibiting COX-2-mediated PGE2 production [J]. Kidney international, 2013, 83(6): 1087-1098.
- [8] Robertson J, Cedergreen J, Nonas S. Lung-specific Cox2 inhibition attenuates ventilator-induced lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185(16): 5454-5458.
- [9] Ni YF, Kuai JK, Lu ZF, et al. Glycyrrhizin treatment is associated with attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression [J]. J Surg Res, 2011, 165(1): 29-35.
- [10] Ethridge RT, Chung DH, Slogoff M, et al. Cyclooxygenase-2 gene disruption attenuates the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury [J]. Gastroenterology, 2002, 123(4): 1311-1322.
- [11] Ping Z, Jiao W, Zhong Z. Sevoflurane pretreatment prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in rats through up-regulated heme oxygenase-1 (HO-1) expression [J]. Afri J Pharmacy Pharmacol, 2011, 5(15): 1765-1772.
- [12] Hsu JT, Yeh HC, Chen TH, et al. Role of Akt/HO-1 pathway in estrogen-mediated attenuation of trauma-hemorrhage-induced lung injury [J]. J Surg Res, 2013, 182(2): 319-325.
- [13] Gómez-Hurtado I, Zapater P, Bellot P, et al. Interleukin-10-mediated heme oxygenase 1-induced underlying mechanism in inflammatory down-regulation by norfloxacin in cirrhosis [J]. Hepatology, 2011, 53(3): 935-944.

(收稿日期: 2015-01-25 修回日期: 2015-03-15)