

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.10.008

文章编号: 1005-8982(2017)10-0040-07

硫化氢提高肠道微循环灌注保护 新生儿坏死性小肠结肠炎

张丙宏¹, 陶弯¹, 钟森², 唐俊明³

(1. 武汉大学人民医院 儿科, 湖北 武汉 430060; 2. 湖北医药学院附属人民医院, 湖北 十堰 442000;
3. 湖北医药学院附属人民医院研究所, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨硫化氢(H₂S)对新生 SD 大鼠坏死性小肠结肠炎(NEC)的肠道微循环作用。**方法** 出生 12 h 内的新生 SD 大鼠 10 只仅用于检测 H₂S 合成酶表达,另 80 只随机分为 4 组:正常对照组、NEC 模型组、NEC+GYY4137 组、NEC+AOAA 组。各组分别予以腹腔注射生理盐水、LPS+生理盐水、LPS+GYY4137、LPS+AOAA。通过人工喂养-缺氧-冷刺激-脂多糖(LPS)方法复制新生鼠 NEC 模型。HE 染色、病理评分以及动物显微镜拍实体照片显示肠组织损伤程度,并统计分析各组新生鼠生存时间,采用 FLPI2 激光散斑血流实时成像系统检测各组血流量变化,探讨 H₂S 对新生鼠 NEC 的肠道微循环保护作用。**结果** 与模型组比较,当给与 NEC 处理鼠 GYY4137 时其肠组织血流量升高($P<0.05$),病理评分降低($P<0.05$);而给予 AOAA 时其病理评分较 NEC 组增加($P<0.05$),但肠组织血流量差异并无统计学意义;NEC 组较正常组病理评分增高,血流量降低。末端回肠与全肠组织血流量均值差异无统计学意义。**结论** H₂S(7.5 mg/kg·d)可通过提高肠道微循环血流量保护 NEC,提高 NEC 新生鼠生存率。

关键词: 新生儿坏死性小肠结肠炎;硫化氢;微循环灌注

中图分类号: R722

文献标识码: A

Exogenous H₂S up-regulates intestinal microcirculation to protect rats from neonatal necrotizing enterocolitis

Bing-hong Zhang¹, Wan Tao¹, Sen Zhong², Jun-ming Tang³

(1. Department of Pediatrics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China; 2. People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 3. Clinical Research Institute, People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To research the effect of H₂S on intestinal microcirculation of newborn SD rats with neonatal necrotizing enterocolitis (NEC). **Methods** Ten newborn Sprague-Dewley (SD) rats were used to detect the expression of H₂S synthase. Eighty SD rats were randomly divided into 4 groups: control group in which the rats were treated with 0.9% NaCl, NEC group in which the rats were treated with LPS+0.9% NaCl, NEC+GYY4137 group in which the rats were treated with LPS+ GYY4137 and NEC+AOAA group in which the rats were treated with LPS+AOAA. GYY4137 is the donor of H₂S and AOAA is the inhibitor of cystathionine β-synthase (CBS). The NEC model of SD rats was induced by bottle-feeding, hypoxia treatment, cold stimulation, and lipopolysaccharide (LPS) peritoneal injection for 3 days. Then HE stain, the Histologic Injury Score and photos taken under animal microscope were used to show the injury of intestinal tissues. What's more, the intestinal microvascular blood flow was detected by real-time imaging system of FLPI2 laser speckle blood flow and the survival time of the newborn rats was surveyed. The protective effect of H₂S on intestinal microcirculation of newborn NEC rats was explored.

收稿日期:2016-12-10

[通信作者] 钟森, E-mail: zhongsens@163.com; Tel: 13807287428

Results Compared with the NEC group, the intestinal microvascular blood flow was significantly increased and the Histologic Injury Score was significantly decreased in the NEC + GYY4137 group ($P < 0.05$). Importantly, administration of AOAA to the NEC rats significantly increased the Histologic Injury Score ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the intestinal microvascular blood flow between the NEC group and the NEC + AOAA group. When compared to the control group, the intestinal microvascular blood flow was significantly decreased and the Histologic Injury Score was significantly increased in the NEC group. **Conclusions** H_2S [7.5 mg/(kg·d)] could protect newborn NEC rats and increase the survival rate by increasing blood flow of intestinal microcirculation.

Keywords: neonatal necrotizing enterocolitis; hydrogen sulfide; intestinal microcirculation

新生儿坏死性小肠结肠炎 (neonatal necrotizing enterocolitis, NEC) 是一种严重的小肠炎症反应, 须及早诊断治疗。然而目前对于 NEC 缺乏有效的诊治、预防手段。其确切病因也并不清楚, 但有研究表明 NEC 的危险因素为肠动力学功能失调、早产、肠内喂养、细菌诱导的肠上皮炎症、肠道微生物入侵、肠道血流量异常等^[1-4]。而 H_2S 于 20 世纪 80 年代被发现, 为继一氧化氮 NO 和一氧化碳 CO 之后的第 3 种内源性气体信号分子, 其生理浓度是 $50 \sim 160 \mu\text{mol/L}$ ^[5-6]。内源性生理浓度的 H_2S 主要由 3 种硫化氢合酶胱硫醚 β 合酶 (CBS)、胱硫醚 γ 裂解酶 (CSE) 和 3- 巯基丙酮酸硫转移酶 (3-MST) 产生^[7]。大量研究探讨了 H_2S 的生理作用, H_2S 能够抗氧化应激, 抗炎抗病毒, 抗细胞凋亡, 抑制自噬, 舒张血管^[8-12]。但对于新生鼠 NEC 模型, 其是否具有明显保护作用及其起作用的主要合酶并不确切, 本实验旨在研究 H_2S 是否能通过提高肠道微循环对新生大鼠 NEC 模型起保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生 12 h 内的 SPF 级新生 SD 大鼠 90 只, 体重为 $(7.6 \pm 0.069)\text{g}$, 购自湖北医药学院动物中心[许可证号: SCXK(鄂)2011-003108]。

1.1.2 试剂 脂多糖 LPS (E.coli 055:B5) (Sigma, 美国), GYY4137 (Sigma, 美国), AOAA (Sigma, 美国), CBS 一抗 (santa cruz, 美国), CSE 一抗 (santa cruz, 美国), 3-MST 一抗 (abcam, 英国), 其他试剂均来自十堰市人民医院临床研究所。

1.2 仪器与设备

ZKY-4F 智能控氧仪, XBS-01 多功能小白鼠试验箱 (爱普仪器设备有限公司, 杭州), HW-1000 超级恒温水浴箱 (泰盟科技有限公司, 成都), SM-3B 手术显微镜 (AmScope, 美国), 莱卡病理系统 (Leica Biosystems, 德国), FLPI2 激光散斑血流实时成像系统 (Perimed AB, 瑞典), 相机 (佳能 D700, 中国)。

1.3 方法

1.3.1 Western blot 检测 H_2S 合成酶的表达 新生 12 h 内 SD 大鼠 10 只, 取距离阑尾处 1 cm 的末端回肠 3 cm, 进行 Western blot 实验检测 H_2S 合成酶胱硫醚 - β - 合酶 (CBS)、胱硫醚 - γ - 裂解酶 (CSE) 和 3- 巯基丙酮酸硫转移酶 (3-MST) 的表达, 结果将在后文显示, NEC 好发部位为末端回肠及近端结肠, 由于新生鼠结直肠段较短, 无法从结肠、十二指肠、直肠中准确分离出近端结肠, 故本实验采用末端回肠进行蛋白检测。

1.3.2 动物分组 采用随机数字表法将 80 只新生 SD 大鼠分为 4 组: 正常对照组、NEC 模型组、NEC+GYY4137 组、NEC+AOAA 组, 每组 20 只, 每组新生鼠体重差异无统计学意义。

1.3.3 喂养方法 正常对照组与母鼠同笼鼠乳喂养, 其余各组给予代乳品喂养, 第 1 天每只小鼠给予代乳品 0.01 ml/次, 4 h/次, 而后每天每次以 0.01 ml 递增, 直至第 3 天, 代乳品配置以及喂养方法参考张丙宏等研究^[13]。

1.3.4 模型复制以及各组干预 NEC 大鼠模型的复制方法参考张丙宏等^[13]研究, 人工喂养 + 缺氧冷刺激 + LPS 腹腔注射 (5 mg/kg) 处理 3 d 制备 NEC 新生鼠模型。代乳品喂养与复制模型时间间隔 2 h, 并于喂代乳品间隔 2 h 后各组给予相应试剂腹腔注射。复制模型组和所有干预组在给予复制处理基础上再给予不同药物腹腔注射, 处理时间也为 3 d。腹腔注射正常对照组给予氯化钠 NaCl 0.12 ml/d, 4 次/d; NEC 模型组给予 0.06 ml/d LPS [5.0 mg/(kg·d)], 2 次/d + 0.06 ml/d 生理盐水 (2 次/d); NEC+GYY4137 组给予 0.06 ml/d LPS (2 次/d) + 0.06 ml/d GYY4137 [7.5 mg/(kg·d)], 2 次/d; NEC+AOAA 组给予 0.06 ml/d LPS (2 次/d) + 0.06 ml/d AOAA [0.05 mmol/(kg·d)], 2 次/d。另为降低非 NEC 相关性死亡率, 复制模型组及所有干预组第 1 次复制处理给予缺氧冷刺激时间为 5 min, LPS 为 2.5 mg/(kg·d)。

1.3.5 标本收集及组织病理学检查 各组新生鼠在末次处理后 12 h 或试验过程中死亡后立即打开腹腔取近回盲部距阑尾 1 cm 处 2 段长约 5 mm 肠段,并用 4%多聚甲醛固定至少 12 h,石蜡包埋后切片,切片厚约 5 μ m,HE 染色,并用显微镜观察玻片是否出现 NEC 以及其程度,评分系统参考 DAVIS 等^[14]的文章,组织学评分结果将在后文列出。组织学改变评分:0 分,无损伤;1 分,上皮细胞肿胀或分离;2 分,绒毛中层坏死;3 分,绒毛全层坏死;4 分,透壁坏死。所有玻片由 2 个人分开独立评分,组织学评分 ≥ 2 分为 NEC。若实验过程中死亡,后 NEC 病理评分 ≥ 2 分,认为是 NEC 相关性死亡,若病理评分 < 2 分认为“非 NEC 相关性死亡”。

1.3.6 血流量检测 各组新生鼠在即将死亡前(不欲进食,不活动,皮肤湿冷紫绀)或者末次处理后异氟烷吸入麻醉 4 min,置于 FLPI2 激光散斑血流实时成像系统黑色操作台上,固定后沿腹正中打开腹腔,充分暴露肠腔以及末端回肠,激光定位后,圈出末端回肠区域为 ROI1,全腹部肠组织区域为 ROI2,而整个激光散斑视野所检测血流量为整个腹部(包括胃、脾、胰腺、肝脏、肠组织等器官)血流量值,记录 5 min,得到血流改变图像、实时动态曲线以及 5 min 平均血流量值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。多样本均数采用样本均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用单因素方差分析,方差不齐使用 Dunnett-T3 检验,Bonferroni 校正后 $P < 0.05$;各组鼠存活情况采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析。末端回肠血流量与全肠组织血流量比较使用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂S 合成酶 CBS、CSE、3-MST 酶表达

新生 12 h 内 SD 大鼠 CBS、CSE、3-MST 酶表达结果如图 1 所示,可见其中 CBS 合酶表达,但 CSE、3-MST 合酶不表达。见图 1。

2.2 一般状况及生存分析

正常对照组新生鼠活动佳、进食良好、排黄色便、体重增加良好,皮肤红润;NEC 组和 NEC+AOAA 组出现活动减少、反应稍迟钝、体重减轻、腹胀腹泻、排黄绿色黏液便甚至黑色血便情况,但 NEC+AOAA 组新生大鼠紫绀、尖叫、早期死亡表现突出,体重降

低。而 NEC+GY4137 组新生大鼠以上表现相较 NEC 组均明显减轻,体重稍降。根据各组新生鼠存活情况进行生存分析显示,NEC 组、NEC+AOAA 组和 NEC+GY4137 组死亡率较正常对照组均升高;而 GYY4137 组其死亡率较 NEC 组降低,AOAA 组死亡率较 NEC 组升高(见图 2)。HE 染色后证实 NEC 组、NEC+GY4137 组、NEC+AOAA 组间非 NEC 相关性死亡分别为 2、2 和 3 只。

2.3 肠组织损伤情况

正常对照组新生鼠空肠呈乳白色,回结肠为淡黄色,红润有光泽(见图 3A);NEC 组新生鼠肠管严重程度扩张、充血,肠壁积气变薄,并有腹水(见图 3B);NEC+GY4137 组为淡黄色轻微充血水肿(见图 3C);AOAA 组肠管大量积气、变脆、发黑、坏死、穿孔、大量腹水(见图 3D)。不同组新生大鼠肠组织典型实体图见图 3。

2.4 各组新生鼠肠组织病理 HE 染色

正常对照组,肠绒毛无损伤(见图 4A);NEC 组,黏膜上皮绒毛顶部、中部以及底部皆有不同程度断裂脱落(见图 4B);GY4137 组绒毛轻度水肿,上皮脱落仅限于绒毛顶部且较少(见图 4C);AOAA 组,绒毛损伤程度较重,大部分绒毛中部、根部断裂,部分隐窝无法识别、可见透壁坏死(见图 4D)。NEC 组病理评分(3.2 ± 0.25)较正常组(0.1 ± 0.07)增高,而 NEC+GY4137 组(1.7 ± 0.19)病理评分较 NEC

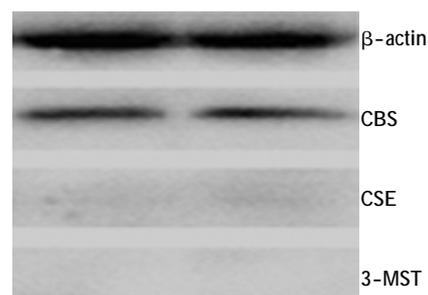


图 1 H₂S 合成酶 CBS、CSE、3-MST 酶表达

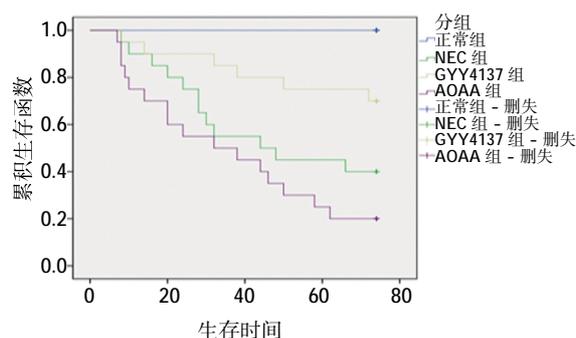


图 2 各组新生鼠生存分析图

组降低, NEC+AOAA 组(3.8 ± 0.24)病理评分较 NEC 组增高。见表 1。

表 1 各组新生鼠肠组织病理评分比较 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	病理评分 / 分
正常对照组	0.1 ± 0.069
NEC 组	$3.2 \pm 0.247^{1)}$
NEC+GY4137 组	$1.7 \pm 0.193^{2)}$
NEC+AOAA 组	$3.8 \pm 0.236^{3,4)}$

注:1) 正常组与 NEC 组比较, $P < 0.05$; 2) NEC 组与 GYY4137 组比较, $P < 0.05$; 3) GYY4137 组与 AOAA 组比较, $P < 0.05$; 4) 正常组与 AOAA 组比较, $P < 0.05$

2.5 血流量变化

各组新生鼠血流图见图 5, 图中血流量大小从 0 至 300 颜色标识依次为从黑色、蓝色、绿色、黄色至红色, 其过渡见图底标尺, 正常组 (见图 5A) 与 GYY4137 组 (见图 5C) ROI1、ROI2 区域血流量可见

以黄、红色居多, 少数绿蓝色, 而 NEC 组 (见图 5B) 与 AOAA 组 (见图 5D) 血流图 ROI1、ROI2 区域以黑色蓝色居多, 图 5 结果显示正常组与 GYY4137 组血流量比 NEC 组与 AOAA 组明显丰富。图 6 中 A~D 显示正常组 (见图 6A), NEC 组 (见图 6B), NEC+GY4137 组 (见图 6C), NEC+AOAA 组 (见图 6D) 5 min 内动态实时血流曲线, 其中蓝色曲线为 ROI1 区域动态实时血流曲线, 红色曲线表示 ROI2 区域动态实时血流曲线, 黑色曲线为激光探头检测范围内血流, 曲线围绕固定基线波动为血流随呼吸上下波动, 图 5A 中头端血流为麻醉稍浅呼吸深大状态时使腹部血流稍增加所致, 并不影响 5 min 整体平均血流值, 图 5B 中尖峰为镊子刺激肠断时引起肠组织血管收缩, 瞬时血流增加所致, 并不影响整体血流均值, 且其立刻恢复正常说明开腹寻找末端回肠的操作并不影响整体血流平均检测值, 因其可在 10 s

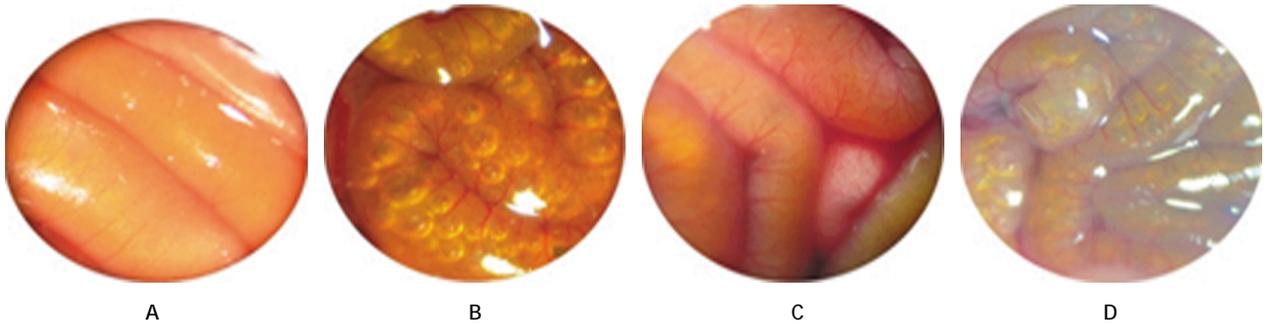


图 3 各组新生鼠肠组织典型实体图

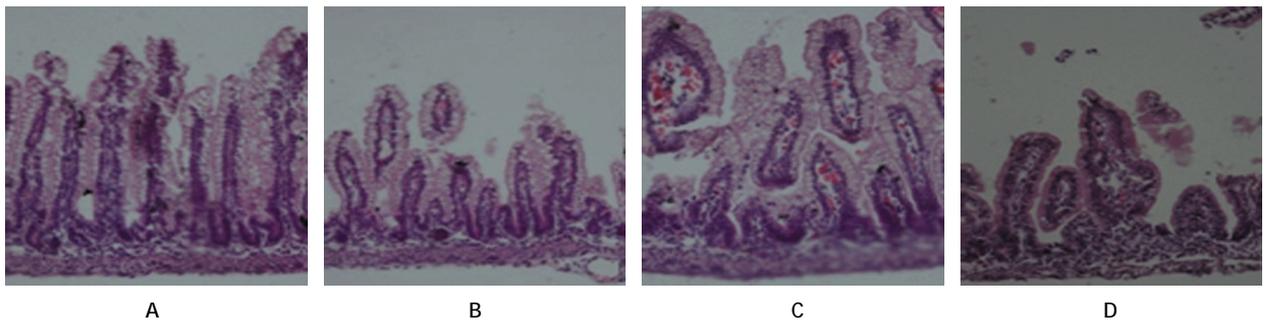


图 4 各组新生鼠肠组织病理 HE 染色

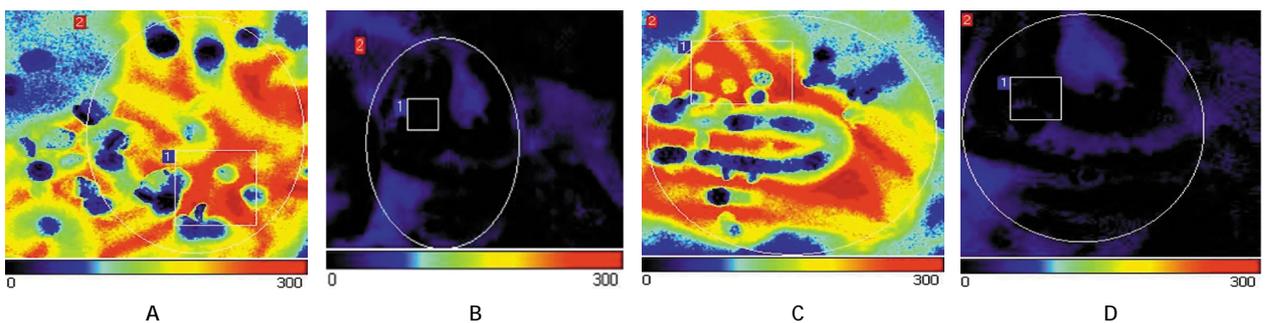


图 5 各组新生鼠肠组织以及腹部血流图

内恢复。图 6 示正常组(见图 6A)血流曲线在 60 左右上下波动, NEC 组(见图 6B)血流曲线在 10 左右上下波动, NEC+GY4137 组(见图 6C)血流曲线在 50 左右上下波动, NEC+AOAA 组(见图 6D)血流曲线在 10 左右波动, 显示正常组与 GYY4137 组血流量比 NEC 组与 AOAA 组明显丰富。表 2 示整个腹部肠组织血流量正常组、NEC 组、NEC+GY4137 组、NEC+AOAA 组各组分别为(60.99 ± 2.983)、(10.79 ±

1.756)、(57.12 ± 2.109)和(10.49 ± 2.608); 末端回肠血流量分别为(75.61 ± 5.937)、(4.28 ± 2.647)、(62.22 ± 5.924)和(6.21 ± 1.49)。各组腹部及末端回肠血流量配对 *t* 检验显示两者之间血流量差异无统计学意义($P > 0.05$)^[9]。以上结果共同表明 NEC 发病过程中肠组织血流量降低($P < 0.05$), 给予 H₂S 供体 GYY4137, 其血流量相对 NEC 组增加, 而给予 AOAA 处理其血流量较 NEC 组差异无统计学意义。

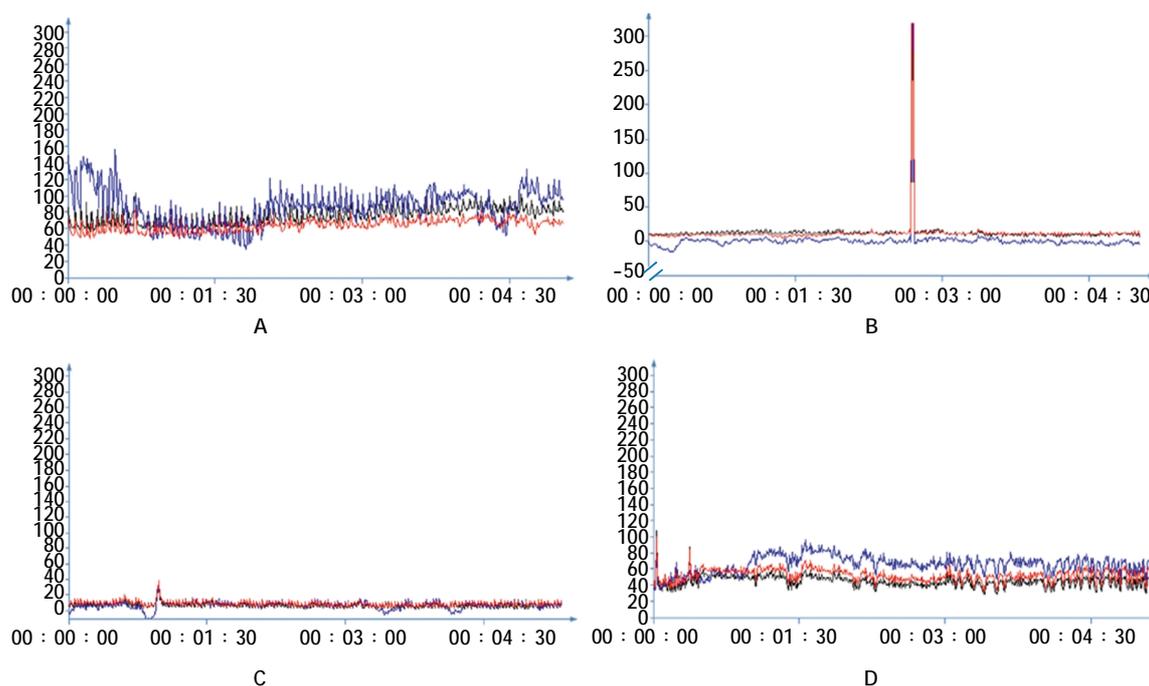


图 6 各组新生鼠肠组织以及腹部动态血流实时曲线

表 2 各组新生鼠全腹部肠组织、末端回肠血流量值比较

($n=7, \bar{x} \pm s$)

组别	全腹部肠组织血流量	末端回肠血流量	<i>t</i> 值	Sig.(双侧)
正常对照	60.99 ± 2.983	75.61 ± 5.937	3.67	0.067
NEC	10.79 ± 1.756 ¹⁾	4.28 ± 2.647 ⁵⁾	-4.23	0.052
NEC+GY4137	57.12 ± 2.109 ²⁾	62.22 ± 5.924 ⁶⁾	2.18	0.160
NEC+AOAA	10.49 ± 2.608 ^{3,4)}	6.21 ± 1.49 ^{7,8)}	-2.83	0.105

注:全腹部肠组织血流量:1)正常组与 NEC 组比较, $P < 0.05$; 2) NEC 组与 GYY 组比较, $P < 0.05$; 3) GYY 组与 AOAA 组比较, $P < 0.05$; 4) 正常组与 AOAA 组比较, $P < 0.05$; 末端回肠血流量:5)正常组与 NEC 组比较, $P < 0.05$; 6) NEC 组与 GYY 组比较, $P < 0.05$; 7) GYY 组与 AOAA 组比较, $P < 0.05$; 8) 正常组与 AOAA 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

CBS、CSE、3-MST 为机体内能够产生内源性 H₂S 的 3 种合酶, CBS 主要存在于脑和肝, 而 CSE 主

要存在于心血管系统, 在不同组织中 CBS 和 CSE 单独或协同作用, 而 3-MST 被发现存在于大脑和外周组织细胞内的线粒体中^[15], 对于新生鼠末端回肠, 其主要产生内源性 H₂S 的合酶为哪一种并不清楚, 本实验用 Western blot 检测末端回肠 CBS、CSE、3-MST 表达, 发现其表达以 CBS 合酶为主, 另外 2 种合酶几乎不表达, 说明生理情况下, 3 d 新生鼠末端回肠主要为 CBS 合酶产生 H₂S。AOAA 为 O-(carboxymethyl)hydroxylamine hemihydrochloride: 羧甲基羟胺半盐酸盐[CBS 合酶抑制剂, 能够抑制内源性 H₂S CBS 合酶表达, 降低 H₂S 含量^[16]。对于 H₂S 的作用研究使用 NAHS 作为供体较多, 但其释放浓度并不稳定, 容易出现 H₂S 过量引起的毒副作用, 本实验使用 GYY4137 [morpholin-4-ium 4 methoxyphenyl(morpholino)phosphinodithioate]来研究 H₂S 的生理作用。GYY4137 是吗啉代二硫化磷酸酯

二氯甲烷复合物,会缓慢而持续释放出少量的 H_2S ,且并不触发导致细胞死亡的信号通路^[17]。肠道血流量异常被认为是 NEC 发病的终末阶段。窒息,早产,喂养过速,感染,免疫系统不成熟等因素导致活性氧,促炎介质激活,以及早产儿肠系膜微循环调节系统不成熟导致内皮功能紊乱,并最终导致肠系膜微循环功能障碍,当应激持续存在时,微循环障碍将有可能进展为凝固性肠坏死,并最终导致 NEC 的发生^[18-19]。而 H_2S 最早被提及的有益生理效应即是其对血流量的作用,KUTZ 等^[20]的研究表明硫化氢对皮肤微循环具有血管舒张作用,CASALINI 等^[21]的研究表明 H_2S 能够通过内皮依赖性舒张功能明显提高微循环血流量。但是,也有研究表明 H_2S 对大鼠脑动脉具有与血管收缩作用^[22],故对于新生 NEC 鼠末端回肠, H_2S 是否具有保护作用并不清楚。

本实验模型组新生大鼠与正常组比一般情况明显变差,肉眼观、HE 染色及病理评分显示肠组织坏死改变,其血流量减低,死亡率升高提示复制模型成功且 NEC 发生时血流量降低;复制模型同时给予 GYY4137 处理,发现其肠坏死情况较模型组减轻,血流量也升高,死亡率降低,但较正常组其肠坏死情况升高,死亡率升高,但血流量无改变,提示 GYY4137 能够提高腹部血流量至接近正常值,从而部分抑制 NEC 的进展,对 NEC 模型鼠具有保护作用。但其提高肠组织血流量作用则易于引起新生大鼠于缺氧时心脑血管血流量降低,引起新生大鼠死亡,这可能是 H_2S 的主要副作用。当给与内源性 H_2S 合酶 CBS 抑制剂 AOAA 时其肠坏死情况较正常组升高,血流量降低,死亡率升高,与模型组比较坏死情况加重,死亡率升高,但血流量差异并无统计学意义。推测可能由于 NEC 组血流量过低,在此基础上给予 AOAA 并不会使血流量更低。说明末端回肠由 CBS 合酶产生 H_2S 维持其生理保护作用,且其作用可能部分与提高血流量有关。各组间末端回肠与全肠组织血流量差异并无统计学意义,说明 H_2S 对 NEC 的保护作用通过提高全肠组织血流量实现,对末端回肠血流量并无更好的保护作用。

据以上实验结果可推测 H_2S 可能通过提高肠组织血流量对新生大鼠 NEC 起部分保护作用,可能为 NEC 的治疗以及预防提供了新的思路。

参 考 文 献:

- [1] PAPILLON S, CASTLE S L, GAYER C P, et al. Necrotizing enterocolitis: contemporary management and outcomes[J]. *Adv Pediatr*, 2013, 60(1): 263-279.
- [2] GRAVE G D, NELSON S A, WALKER W A, et al. New therapies and preventive approaches for necrotizing enterocolitis: report of a research planning workshop[J]. *Pediatr Res*, 2007, 62(4): 510-514.
- [3] AFRAZI A, SODHI C P, RICHARDSON W, et al. New insights into the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis: Toll-like receptors and beyond[J]. *Pediatr Res*, 2011, 69(3): 183-188.
- [4] BERMAN L, MOSS R L. Necrotizing enterocolitis: an update[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2011, 16(3): 145-150.
- [5] WANG R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed[J]. *Physiol Rev*, 2012, 92(2): 791-896.
- [6] WANG R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter [J]. *FASEB J*, 2002, 16(13): 1792-1798.
- [7] POLHEMUS D J, LEFER D J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2014, 114(4): 730-737.
- [8] ZHENG J, ZHAO T, YUAN Y, et al. Hydrogen sulfide (H_2S) attenuates uranium-induced acute nephrotoxicity through oxidative stress and inflammatory response via Nrf2-NF- κ B pathways[J]. *Chem Biol Interact*, 2015(242): 353-362.
- [9] IVANCIUC T, SBRANA E, ANSAR M, et al. Hydrogen Sulfide: An Antiviral and Anti-inflammatory Endogenous Gasotransmitter in the Airways. Role in Respiratory Syncytial Virus Infection[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(5): 684-696.
- [10] LEI Y, ZHEN Y, ZHANG W, et al. Exogenous hydrogen sulfide exerts proliferation, anti-apoptosis, angiogenesis and migration effects via activating HSP90 pathway in EC109 cells[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(6): 3714-3720.
- [11] JIANG H, XIAO J, KANG B, et al. PI3K/SGK1/GSK3 β signaling pathway is involved in inhibition of autophagy in neonatal rat cardiomyocytes exposed to hypoxia/reoxygenation by Hydrogen sulfide[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 345(2): 134-140.
- [12] YANCHUK P I, SLOBODIANYK L A. The role of hydrogen sulfide in regulation of circulation blood liver [J]. *Fiziol Zh*, 2015, 61(3): 28-34.
- [13] 张丙宏, 席世兵, 钟森, 等. 硫化氢对新生鼠坏死性小肠结肠炎的抗炎保护作用[J]. *中国新生儿科杂志*, 2016(3): 217-221.
- [14] DAVIS K M, BRIGSTOCK D R, JOHNSON P R, et al. Production of glycosylated heparin-binding EGF-like growth factor in HeLa cells using vaccinia virus[J]. *Protein Expr Purif*, 1996, 8(1): 57-67.
- [15] SHIBUYA N, MIKAMI Y, KIMURA Y, et al. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide[J]. *J Biochem*, 2009, 146(5): 623-626.
- [16] WANG X Y, YANG H W. Upregulation of CBS/ H_2S system contributes to asymmetric dimethylarginine-triggered protection

[1] PAPILLON S, CASTLE S L, GAYER C P, et al. Necrotizing

- against the neurotoxicity of glutamate to PC12 cells by inhibiting NOS/NO Pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 346(1): 111-118.
- [17] LI L, WHITEMAN M, GUAN Y Y, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide[J]. *Circulation*, 2008, 117(18): 2351-2360.
- [18] CARLISLE E M, POROYKO V, CAPLAN M S, et al. Gram negative bacteria are associated with the early stages of necrotizing enterocolitis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18084.
- [19] ZHANG H Y, WANG F, FENG J X. Intestinal microcirculatory dysfunction and neonatal necrotizing enterocolitis[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(9): 1771-1778.
- [20] KUTZ J L, GREANEY J L, SANTHANAM L, et al. Evidence for a functional vasodilatory role for hydrogen sulphide in the human cutaneous microvasculature[J]. *J Physiol*, 2015, 593(9): 2121-2129.
- [21] CASALINI E D, GOODWILL A G, OWEN M K, et al. Contribution of hydrogen sulfide to the control of coronary blood flow[J]. *Microcirculation*, 2014, 21(2): 104-111.
- [22] LI S, PING N N, CAO L, et al. H₂S induces vasoconstriction of rat cerebral arteries via cAMP/adenylyl cyclase pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 289(3): 389-396.

(张西倩 编辑)