

【基础研究】

作者简介:李泽信(1980-),男,河南周口人,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:肝胆胰外科基础与临床。

of inferior vena cava and hepatic tissues were obtained. The expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 mRNA in hepatic tissues of mice in each group was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in hepatic tissues of mice were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, while the levels of serum alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The pathological changes of hepatic tissues were observed by hematoxylin-eosin staining, and the percentage of necrotic area of hepatic tissues was calculated. **Results** After six hours of reperfusion, the relative expression of NF- κ B p65 mRNA in hepatic tissues of mice in the sham operation group, ischemia-reperfusion group, low-dose fisetin group and high-dose fisetin group was 1.012 ± 0.224 , 6.893 ± 0.716 , 3.287 ± 0.402 and 1.238 ± 0.311 , respectively. The relative expression of NF- κ B p65 mRNA in hepatic tissues of mice in the ischemia-reperfusion group was significantly higher than that in the sham operation group ($P < 0.05$). The relative expression of NF- κ B p65 mRNA in hepatic tissues of mice in the low-dose fisetin group was significantly lower than that in the ischemia-reperfusion group ($P < 0.05$). The relative expression of NF- κ B p65 mRNA in hepatic tissues of mice in the high-dose fisetin group was significantly lower than that in the low-dose fisetin group ($P < 0.05$). After six hours of reperfusion, the levels of TNF- α and IL-6 in hepatic tissues and the levels of serum ALT and AST in the ischemia-reperfusion group were significantly higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$), the levels of TNF- α and IL-6 in hepatic tissues and the levels of serum ALT and AST in the low-dose fisetin group were significantly lower than those in the ischemia-reperfusion group ($P < 0.05$), the levels of TNF- α and IL-6 in hepatic tissues and the levels of serum ALT and AST in the high-dose fisetin group were significantly lower than those in the low-dose fisetin group ($P < 0.05$). The necrotic area of hepatic tissues in the sham operation group, ischemia-reperfusion group, low-dose fisetin group and high-dose fisetin group was $(0.698 \pm 0.127)\%$, $(51.65 \pm 3.41)\%$, $(28.847 \pm 2.069)\%$ and $(19.877 \pm 1.213)\%$, respectively. The necrotic area of hepatic tissues in the ischemia-reperfusion group was significantly larger than that in the sham operation group ($P < 0.05$). The necrotic area of hepatic tissues in the low-dose fisetin group was significantly smaller than that in the ischemia-reperfusion group ($P < 0.05$). The necrotic area of hepatic tissues in the high-dose fisetin group was significantly smaller than that in the low-dose fisetin group ($P < 0.05$). **Conclusion** Fisetin pretreatment can significantly reduce the liver injury induced by ischemia-reperfusion in mice, and the mechanism may be related to inhibiting the activation of NF- κ B inflammatory pathway.

Key words: fisetin; ischemia-reperfusion; liver injury; nuclear factor- κ B; inflammatory injury

肝脏缺血再灌注损伤是指在肝脏外科手术肝门阻断后或者移植肝脏重新恢复正常血流灌注后反而出现肝脏损伤加重的现象^[1]。炎症因子表达和炎症细胞浸润是缺血再灌注损伤发生的重要机制^[2]。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)作为调节机体炎症瀑布反应的关键性转录启动因子,可以调控肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等下游炎症因子的分泌^[3]。漆黄素是广泛存在于水果、蔬菜和植物中的一种黄酮类化合物^[4-5],具有抗炎、抗氧化、抗癌、抗真菌和镇痛等作用^[6-9]。研究发现,漆黄素可通过抑制 NF- κ B 通路而减轻心肌缺血性损伤^[10]。在脑缺血再灌注损伤小鼠模型中, NF- κ B 炎症信号通路参与了漆黄素的脑保护作用^[11]。但漆黄素对缺血再灌注肝脏炎症性损伤的保护作用尚未见报道。本研究旨在探讨漆黄素对小鼠缺血再灌注肝脏损伤的保护作用及其可能机制,为肝脏缺血再灌注损伤的防治提供新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 24 只, 体质量 20~25 g, 由河南省实验动物中心提供。给予适应性喂养, 12 h 光照、12 h 黑暗交替, 温度

(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 45%~55%, 自由进食、水。

1.2 试剂与仪器 漆黄素购自美国 Sigma 公司, TRIzol 试剂购自美国 ThermoFisher 公司, TNF- α 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司, IL-6 ELISA 检测试剂盒购自美国 ADL 公司, 丙氨酸转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate transaminase, AST) ELISA 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; ABI 7500 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购自美国 Applied biosystems 公司, BS-220 全自动生物化学分析仪购自深圳迈瑞医疗国际股份有限公司, TD-24K 离心机购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.3 实验分组及处理 将 24 只小鼠随机分为假手术组、缺血再灌注组、低剂量漆黄素组和高剂量漆黄素组, 每组 6 只。缺血再灌注组、低剂量漆黄素组和高剂量漆黄素组小鼠建立肝脏缺血再灌注模型, 假手术组小鼠仅进行开腹手术。模型制作前 1 h, 低剂量漆黄素组和高剂量漆黄素组小鼠分别腹腔注射漆黄素 25、50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 假手术组和缺血再灌注组小鼠腹腔注射等体积的 DMSO。小鼠肝脏缺血再灌

注损伤模型制备方法^[12]:小鼠以 40 g · L⁻¹水合氯醛腹腔注射(0.1 mL · 10 g⁻¹)麻醉后仰卧固定于 37 ℃ 恒温的小动物加热垫上,常规消毒后上腹部正中切口,逐层打开腹壁入腹腔,充分暴露肝脏区,分离肝左叶和中叶的门静脉及肝动脉,并用血管夹夹闭以阻断血流,使 70% 的肝脏缺血,当被夹闭的肝组织颜色变浅时即肝血管阻断成功,血管夹夹闭腹腔后小鼠置于 37 ℃ 孵育箱内,血流阻断 1 h 后,打开腹腔并松开血管夹,使肝脏进行再灌注,逐层缝合关闭腹腔。再灌注 6 h 后再次以 40 g · L⁻¹水合氯醛腹腔注射(0.1 mL · 10 g⁻¹)麻醉小鼠,获取下腔静脉血液样本及肝脏;3 000 r · min⁻¹离心 15 min,分离血清,置于 -80 ℃ 冰箱中保存,用于生物化学指标检测;取部分肝组织,体积分数 10% 甲醛溶液固定后制备石蜡切片;另取部分肝组织迅速放入液氮中,转于 -80 ℃ 冰箱中保存,用于检测 TNF-α、IL-6 和 NF-κB 水平。

1.4 实时荧光定量 PCR 法检测小鼠肝组织中 NF-κB p65 mRNA 表达 取 -80 ℃ 冰箱保存的小鼠肝组织,以 TRIzol 试剂提取总 RNA,反转录为 cDNA,进行实时荧光定量 PCR。NF-κB p65 引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,上游引物序列为 5'-TGCACCTAGCTGC-3',下游引物序列为 5'-TCTGCTCCTGCT-3';以 β-actin 为内参。PCR 反应条件:95 ℃、30 s;95 ℃、5 s,60 ℃、34 s,循环 40 次;95 ℃、15 s,60 ℃、60 s,95 ℃、15 s;绘制溶解曲线;按收集的荧光信号 Ct 值计算(2^{-ΔΔCt}法)NF-κB p65 mRNA 的相对表达量。

1.5 ELISA 法检测小鼠肝组织中 TNF-α 和 IL-6 水平 称取各组小鼠肝组织 0.2 g,按质量(g):体积(mL) = 1:9 的比例加入生理盐水,冰浴条件下机械匀浆,制备成 100 g · L⁻¹的匀浆上清液,采用 ELISA 法检测小鼠肝组织中 TNF-α 和 IL-6 水平,严格按照试剂盒说明书进行检测。

1.6 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察小鼠肝组织病理学变化 取各组小鼠肝组织,体积分数 10% 甲醛溶液固定,采用乙醇梯度(体积分数分别为 80%、90%、95%、100%)脱水,二甲苯透明,制作组织石蜡切片;然后脱蜡、水化,首先苏木精染色 15 min,盐酸乙醇溶液分化 5 s 后氨水溶液返蓝,再用伊红染色 5 min,最后脱水、透明、封片,在光学显微镜下观察并拍照,采用 Image J 图像分析软件计算肝组织坏死面积所占百分比。

1.7 小鼠肝脏功能检测 取于 -80 ℃ 冰箱中保存的各组小鼠的血清,采用 ELISA 法检测血清 ALT 和 AST 水平,严格按照试剂盒说明步骤进行检测。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组

样本均数比较采用单因素方差分析,各组样本均数的两两比较采用最小显著性差异法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组小鼠肝组织中 NF-κB p65 mRNA 相对表达量比较 再灌注 6 h 后,假手术组、缺血再灌注组、低剂量漆黄素组和高剂量漆黄素组小鼠肝组织中 NF-κB p65 mRNA 相对表达量分别为 1.012 ± 0.224、6.893 ± 0.716、3.287 ± 0.402、1.238 ± 0.311;缺血再灌注组小鼠肝组织中 NF-κB p65 mRNA 相对表达量显著高于假手术组,低剂量漆黄素组小鼠肝组织中 NF-κB p65 mRNA 相对表达量显著低于缺血再灌注组,高剂量漆黄素组小鼠肝组织中 NF-κB p65 mRNA 相对表达量显著低于低剂量漆黄素组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 4 组小鼠肝组织中 TNF-α 和 IL-6 水平比较 结果见表 1。再灌注 6 h 后,缺血再灌注组小鼠肝组织中 TNF-α 和 IL-6 水平显著高于假手术组,低剂量漆黄素组小鼠肝组织中 TNF-α 和 IL-6 水平显著低于缺血再灌注组,高剂量漆黄素组小鼠肝组织中 TNF-α 和 IL-6 水平显著低于低剂量漆黄素组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 4 组小鼠肝组织中 TNF-α 和 IL-6 水平比较
Tab. 1 Comparison of the levels of TNF-α and IL-6 in hepatic tissues of mice among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α/(ng · L ⁻¹)	IL-6/(ng · L ⁻¹)
假手术组	6	83.65 ± 6.38	62.32 ± 5.12
缺血再灌注组	6	189.51 ± 7.19 ^a	167.46 ± 3.98 ^a
低剂量漆黄素组	6	130.72 ± 5.48 ^b	107.63 ± 6.06 ^b
高剂量漆黄素组	6	105.16 ± 3.74 ^c	86.02 ± 4.28 ^c

注:与假手术组比较^a $P < 0.05$;与缺血再灌注组比较^b $P < 0.05$;与低剂量漆黄素组比较^c $P < 0.05$ 。

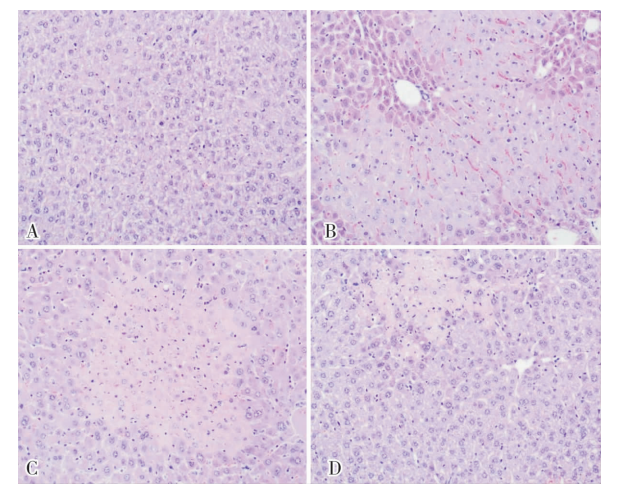
2.3 4 组小鼠血清 ALT 和 AST 水平比较 结果见表 2。再灌注 6 h 后,缺血再灌注组小鼠血清 ALT 和 AST 水平显著高于假手术组,低剂量漆黄素组小鼠血清 ALT 和 AST 水平显著低于缺血再灌注组,高剂量漆黄素组小鼠血清 ALT 和 AST 水平显著低于低剂量漆黄素组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 4 组小鼠血清 ALT 和 AST 水平比较
Tab. 2 Comparison of the levels of serum TNF-α and IL-6 of mice among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT/(U · L ⁻¹)	AST/(U · L ⁻¹)
假手术组	6	53.46 ± 12.11	102.84 ± 23.99
缺血再灌注组	6	213.45 ± 49.51 ^a	422.55 ± 99.30 ^a
低剂量漆黄素组	6	158.78 ± 35.98 ^b	290.63 ± 67.34 ^b
高剂量漆黄素组	6	108.85 ± 25.73 ^c	194.72 ± 45.32 ^c

注:与假手术组比较^a $P < 0.05$;与缺血再灌注组比较^b $P < 0.05$;与低剂量漆黄素组比较^c $P < 0.05$ 。

2.4 4 组小鼠肝组织病理学变化 结果见图 1。假手术组小鼠肝组织形态正常,无明显病理学改变(图 1A);缺血再灌注组小鼠肝组织出现静脉扩张充血、肝细胞水肿和灶状坏死,大量中性粒细胞浸润,部分细胞核固缩、染色加深(图 1B);低剂量漆黄素组和高剂量漆黄素组小鼠肝细胞水肿和静脉充血明显减轻,中性粒细胞浸润明显减少,肝组织坏死面积明显缩小(图 1C 和图 1D)。假手术组、缺血再灌注组、低剂量漆黄素组和高剂量漆黄素组小鼠肝组织坏死面积分别为 $(0.698 \pm 0.127)\%$ 、 $(51.650 \pm 3.410)\%$ 、 $(28.847 \pm 2.069)\%$ 、 $(19.877 \pm 1.213)\%$;缺血再灌注组小鼠肝组织坏死面积显著大于假手术组,低剂量漆黄素组小鼠肝组织坏死面积显著小于缺血再灌注组,高剂量漆黄素组小鼠肝组织坏死面积显著小于低剂量漆黄素组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



A:假手术组;B:缺血再灌注组;C:低剂量漆黄素组;D:高剂量漆黄素组。

图 1 各组小鼠肝脏缺血再灌注 6 h 后肝组织病理学改变 (HE 染色, ×200)

Fig. 1 Pathological changes of hepatic tissues of mice in the four groups after ischemia-reperfusion for six hours (HE staining, ×200)

3 讨论

缺血再灌注损伤是一种有炎症细胞浸润的无菌性炎症过程^[13]。缺血再灌注损伤的发生机制主要与再灌注后的炎症反应、细胞内钙超载、线粒体功能障碍、氧化应激和白细胞浸润等有关,而炎症反应是缺血再灌注损伤病理过程中最主要的介导因素^[14]。NF-κB 在非酒精性脂肪肝炎症性损伤过程中起着调控级联炎症反应的枢纽性作用,直接反映炎症瀑布

效应的发生^[15]。本研究结果显示,肝脏再灌注 6 h 后,缺血再灌注组小鼠肝组织中 NF-κB p65 mRNA 相对表达量显著高于假手术组,低剂量漆黄素组小鼠肝组织中 NF-κB p65 mRNA 相对表达量显著低于缺血再灌注组,高剂量漆黄素组小鼠肝组织中 NF-κB p65 mRNA 相对表达量显著低于低剂量漆黄素组;提示漆黄素对缺血再灌注肝组织中 NF-κB 基因表达具有剂量依赖性抑制作用,漆黄素可能通过抑制 NF-κB 通路而减轻肝脏缺血再灌注损伤。既往研究认为,NF-κB 炎症信号通路参与了漆黄素对心肌缺血性损伤和脑缺血再灌注损伤的保护^[10-11],这与本研究结果一致。

肝脏缺血再灌注后会激活巨噬细胞分泌 TNF-α、IL-6 等炎症因子^[16-17],TNF-α、IL-6 是 NF-κB 下游的靶基因,组织器官缺血再灌注后 NF-κB 转位入核启动 TNF-α、IL-6 合成与分泌,表达增多的 TNF-α 和 IL-6 又反过来激活 NF-κB 通路,形成正反馈级联反应,导致 TNF-α、IL-6 等炎症因子的不断释放,最终产生瀑布样炎症效应^[18]。因此,缺血再灌注肝组织中 TNF-α、IL-6 水平直接反映缺血再灌注肝脏炎症性损伤的程度。本研究结果显示,再灌注 6 h 后,缺血再灌注组小鼠血清 TNF-α 和 IL-6 水平显著高于假手术组,低剂量漆黄素组小鼠血清 TNF-α 和 IL-6 水平显著低于缺血再灌注组,高剂量漆黄素组小鼠血清 TNF-α 和 IL-6 水平显著低于低剂量漆黄素组;提示漆黄素能显著降低缺血再灌注肝组织中 TNF-α、IL-6 水平,对缺血再灌注肝脏炎症性损伤具有保护作用,且存在量效关系。

本研究结果显示,再灌注 6 h 后,缺血再灌注组小鼠血清 ALT 和 AST 水平显著高于假手术组,低剂量漆黄素组小鼠血清 ALT 和 AST 水平显著低于缺血再灌注组,高剂量漆黄素组小鼠血清 ALT 和 AST 水平显著低于低剂量漆黄素组;表明漆黄素对缺血再灌注小鼠的肝功能具有保护作用。肝组织中 TNF-α、IL-6 水平升高直接造成肝细胞损伤引起肝功能变化的同时,还可以通过作用于血管内皮细胞而导致血管壁通透性增加,中性粒细胞等炎症细胞随血流游走迁移造成缺血部位炎症细胞浸润^[19];聚集浸润的中性粒细胞产生氧自由基、趋化因子、弹性蛋白酶和蛋白水解酶类而造成缺血再灌注肝组织坏死增加^[20]。本研究结果显示,假手术组小鼠肝脏组织学形态正常;缺血再灌注组小鼠肝组织出现静脉扩张充血、肝细胞水肿和灶状坏死,大量中性粒细胞

浸润,部分细胞核固缩染色加深;低剂量漆黄素组和高剂量漆黄素组小鼠肝细胞水肿和静脉充血明显减轻,中粒细胞浸润明显减少,肝组织坏死面积明显缩小。因此推测,漆黄素在降低缺血再灌注肝组织中 TNF- α 、IL-6 水平的同时,对缺血再灌注肝脏中性粒细胞浸润也有抑制作用,从而减少缺血再灌注肝组织坏死,保护缺血再灌注肝脏结构与功能。

综上所述,漆黄素预处理可以显著减轻小鼠缺血再灌注肝脏损伤,且存在剂量依赖性,其保护机制可能与抑制 NF- κ B 转录激活有关。本研究为深入研究漆黄素如何具体调控炎症信号通路提供了实验依据,为肝脏缺血再灌注损伤的防治提供新的可能治疗靶点。

参考文献:

- [1] CANNISTRÁ M, RUGGIERO M, ZULLO A, *et al.* Hepatic ischemia reperfusion injury: a systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers[J]. *Int J Surg*, 2016, 33(Suppl 1): S57-S70.
- [2] ZAKI A M, EL-TANBOULY D M, ABDELSALAM R M, *et al.* Plumbagin ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: role of high mobility group box 1 in inflammation, oxidative stress and apoptosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 785-793.
- [3] ZHAO X J, YANG Y Z, ZHENG Y J, *et al.* Magnesium isoglycyrrhizinate blocks fructose-induced hepatic NF- κ B/NLRP3 inflammasome activation and lipid metabolism disorder[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 809: 141-150.
- [4] TSAI Y H, LIN J J, MA Y S, *et al.* Fisetin inhibits cell proliferation through the induction of G₀/G₁ phase arrest and caspase-3-mediated apoptosis in mouse leukemia cells[J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(4): 841-863.
- [5] 陈锐娥, 陈文荣, 龙晓英. 非瑟酮抗肿瘤药理、药动学及新剂型研究进展[J]. *广东药科大学学报*, 2017, 33(4): 565-569.
- [6] ALTHUNIBAT O Y, AL HROOB A M, ABUKHALIL M H, *et al.* Fisetin ameliorates oxidative stress, inflammation and apoptosis in diabetic cardiomyopathy[J]. *Life Sci*, 2019, 221: 83-92.
- [7] TABASUM S, SINGH R P. Fisetin suppresses migration, invasion and stem-cell-like phenotype of human non-small cell lung carcinoma cells via attenuation of epithelial to mesenchymal transition[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 303: 14-21.
- [8] REIS M P, CARVALHO C R C, ANDRADE F A, *et al.* Fisetin as a promising antifungal agent against *Cryptococcus neoformans* species complex[J]. *J Appl Microbiol*, 2016, 121(2): 373-379. DOI: 10.1111/jam.13155.
- [9] ZHAO X, LI X L, LIU X, *et al.* Antinociceptive effects of fisetin against diabetic neuropathic pain in mice: engagement of antioxi-

- dant mechanisms and spinal GABAA receptors[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 102: 286-297.
- [10] GARG S, MALHOTRA R K, KHAN S I, *et al.* Fisetin attenuates isoproterenol-induced cardiac ischemic injury *in vivo* by suppressing RAGE/NF- κ B mediated oxidative stress, apoptosis and inflammation[J]. *Phytomedicine*, 2019, 56: 147-155.
- [11] GELDERBLUM M, LEYPOLDT F, LEWERENZ J, *et al.* The flavonoid fisetin attenuates postischemic immune cell infiltration, activation and infarct size after transient cerebral middle artery occlusion in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(5): 835-843.
- [12] 赵延兵, 张玮, 苏瑜恒, 等. 微小 RNA-30b-3p 在肝脏缺血再灌注损伤小鼠肝组织中的表达及意义[J]. *新乡医学院学报*, 2018, 35(5): 361-367.
- [13] FAN Q, TAO R, ZHANG H, *et al.* Dectin-1 contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating macrophage polarization and neutrophil infiltration[J]. *Circulation*, 2019, 139(5): 663-678.
- [14] LIU J, CHEN T, LEI P, *et al.* Exosomes released by bone marrow mesenchymal stem cells attenuate lung injury induced by intestinal ischemia reperfusion via the TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(9): 1238-1244.
- [15] 田香, 熊琪, 陈琳, 等. 梓醇对高脂诱导小鼠非酒精性脂肪肝的干预作用[J]. *中国医学科学院学报*, 2019, 41(6): 746-755.
- [16] JIANG M, LI J, PENG Q X, *et al.* Neuroprotective effects of bilobalide on cerebral ischemia and reperfusion injury are associated with inhibition of pro-inflammatory mediator production and down-regulation of JNK1/2 and p38 MAPK activation[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 167.
- [17] LIU X J, MEI Z G, QIAN J P, *et al.* Puerarin partly counteracts the inflammatory response after cerebral ischemia/reperfusion via activating the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(34): 3203-3215.
- [18] YUAN L, DAI X, FU H, *et al.* Vaspin protects rats against myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI) through the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 835: 132-139.
- [19] ZHANG X, ZHAO J, ZHU W, *et al.* Synergistic effect of subtoxic-dose cisplatin and TRAIL to mediate apoptosis by down-regulating decoy receptor 2 and up-regulating caspase-8, caspase-9 and bax expression on NCI-H460 and A549 cells[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2013, 16(5): 710-718.
- [20] OLIVEIRA T H C, MARQUES P E, PROOST P, *et al.* Neutrophils: a cornerstone of live ischemia and reperfusion injury[J]. *Lab Invest*, 2018, 98(1): 51-62.

(本文编辑:徐自超)