

- [17] 于春林, 张国志. 一氧化氮对急性胰腺炎影响的研究进展 [J]. 实用药物与临床, 2016, 19(7): 909-912. DOI:10.14053/j.cnki.ppcr.201607032.
- [18] Anlir E, Özen F, Özemir İA, et al. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile and TLR2 intron 2 microsatellite gene polymorphism in patients with acute biliary pancreatitis: Does it cause the disease?[J]. Turk J Surg, 2018, 34(3): 191-197. DOI:10.5152/turkjsurg.2017.3828.
- [19] Yanagawa M, Uchida K, Ando Y, et al. Basophils activated via TLR signaling may contribute to pathophysiology of type 1 autoimmune pancreatitis[J]. J Gastroenterol, 2018, 53(3): 449-460. DOI:10.1007/s00535-017-1390-6.
- [20] 胡珺晖, 梅启享, 曾悦. TLR4 在重症急性胰腺炎相关肠道屏障损伤中调节机制的研究进展 [J]. 国际消化病杂志, 2020, 40(4): 235-238. DOI:10.3969/j.issn.1673-534X.2020.04.006.
- [21] 孙攀兴, 邱春光. 大黄素通过调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路对脂多糖诱导血管内皮细胞氧化损伤的保护作用研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43: 1040-1045.
- [22] 牛泽群, 王立明, 冯辉, 等. TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路在急性重症胰腺炎相关肺损伤大鼠中的作用研究 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2019, 24: 1404-1407.
- [23] 王立明, 冯辉, 牛泽群, 等. 血红素加氧酶-1 对急性重症胰腺炎相关肺损伤 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(4): 661-664, 736. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2020.04.012.
- [24] Guo H Y, Cui Z J. Extracellular histones activate plasma membrane Toll-like receptor 9 to trigger calcium oscillations in rat pancreatic acinar tumor cell AR4-2J[J]. Cells, 2019, 8(1):3. DOI:10.3390/cells8010003
- [25] Hsiao PJ, Chiou HYC, Jiang HJ, et al. Pioglitazone enhances cytosolic lipolysis,  $\beta$ -oxidation and autophagy to ameliorate hepatic steatosis[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1-11. DOI:10.1038/s41598-017-09702-3.
- [26] Nagao S, Baba T, Fujibe Y, et al. Pioglitazone suppresses excessive follicular development in murine preantral follicles[J]. J Ovarian Res, 2019, 12(1): 82. DOI:10.1186/s13048-019-0556-7.
- [27] 徐宝琪, 李伊倩, 陈渠发. 吡格列酮对重症急性胰腺炎血清核因子- $\kappa$ B 的影响以及临床疗效研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(5): 353-355. DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2017.05.08.
- [28] 赵凯亮, 陈辰, 余佳, 等. 罗格列酮对伴高脂血症大鼠重症急性胰腺炎肺损伤的作用研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25(11):1418-1423. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.11.013.

(收稿日期: 2021-03-11)

(本文编辑: 何小军)

## ISO-1 通过抑制 NLRP3 炎症小体信号通路保护急性胰腺炎

刘燕燕, 程波, 张岩, 陈三洋, 刘艳娜, 宋耀东, 王巧芳, 朱长举  
 郑州大学第一附属医院急诊外科 450000, 河南省急诊与创伤研究医学重点实验室 450000

通信作者: 朱长举, Email: zhuchangju98@163.com

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20190302); 河南省高等学校重点科研项目 (20A320018); 河南省高等学校重点科研项目 (20A320064)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.08.009

急性胰腺炎 (AP) 是一种常见的急腹症, 大多数患者表现为轻型急性胰腺炎, 具有一定的限性, 约有 20% 可进展为重症急性胰腺炎, 病死率可高达 20%~40%<sup>[1]</sup>。目前随着时代发展, 急性胰腺炎发病呈现升高趋势<sup>[2]</sup>, 但尚无有效的办法控制急性胰腺炎的进展。ISO-1 是一种巨噬细胞移动抑制因子 (MIF) 的抑制剂, 具有有效的抗炎、抗肿瘤活性<sup>[3]</sup>, 对脓毒症<sup>[4]</sup>、结肠炎<sup>[5]</sup>、胰腺癌<sup>[6]</sup>等多种疾病模型均具有保护作用。之前的研究也证明了使用 MIF 抑制剂或敲除 MIF 基因对于急性胰腺炎及其相关肺损伤有保护作

用<sup>[7-8]</sup>, 但具体机制尚不清楚。本研究旨在探索 ISO-1 在急性胰腺炎中发挥保护作用的机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验试剂

L-精氨酸和 BCA 蛋白检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。ISO-1 购自美国 MCE 公司。RIPA 裂解缓冲液、磷酸酶抑制剂和辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的次级抗体购自上海碧云天生物技术公司, 血清淀粉酶和脂肪酶联免疫

吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自上海酶联生物技术科技有限公司。丙二醛 (MDA) 和超歧物过氧化物酶 (SOD) 测定试剂盒购自南京建城生物工程研究所。NLRP3 抗体购自美国博士德生物工程有限公司, IL-1 $\beta$  抗体购自美国 CST 公司, MIF 和  $\beta$ -actin 抗体购自中国 Abways 技术公司。

## 1.2 动物模型

本实验所需 C57BL/6 小鼠从华兴动物实验中心购买, 年龄 6~8 周, 体质量 18~20 g。将其随机 (随机数字法) 分为 3 组, 每组 6 只, 分别为对照 (CON) 组、模型 (AP) 组和治疗 (ISO-1) 组。对照组接受腹腔注射两次等剂量生理盐水, AP 模型组接受腹腔注射两次 L-精氨酸 (4 g/kg, pH=7, 最终浓度 8%), 间隔 1 h; ISO-1 治疗组在 AP 造模前 30 min, 给予一次腹腔注射 ISO-1 (3.5 mg/kg)。所有小鼠均在最后一次注射 72 h 后处死, 取胰腺组织标本和血标本待用, 所有动物和实验程序均符合郑州大学第一附属医院伦理研究委员会 (伦理审查编号 2019-KY-140)。

## 1.3 胰腺组织组织学评分

胰腺组织标本用 4% 多聚甲醛固定, 制备成 HE 切片。每张切片随机选择 10 个高倍镜视野, 根据现有的组织学评估方法<sup>[7]</sup>进行评分。

## 1.4 血清淀粉酶脂肪酶测定

用 ELISA 试剂盒测定小鼠血清中淀粉酶脂肪酶水平。

## 1.5 胰腺组织 MDA 和 SOD 测定

用生化试剂盒检测胰腺组织匀浆中 MDA 和 SOD, 检测步骤及计算方法均按照说明书进行。

## 1.6 蛋白免疫印迹

根据 BCA 试剂盒测定的各蛋白样品浓度, 取等质量蛋白上样, 经过聚丙烯酰胺电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育等步骤, 使用双色红外激光成像系统进行图像采集, 并使用 Image-J 软件测定蛋白条带灰度值。

## 1.7 统计学方法

所有统计数据均采用 SPSS 21.0 进行统计学分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示, 多组间均数比较使用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 各组间大体标本病理变化

相对于对照组, AP 组小鼠出现明显腹水, 肝脏、肺组织及肾组织出现明显出血点, 胰腺组织出现明显肿大和坏死。ISO-1 治疗组小鼠未出现腹水, 肝脏、肺组织及肾组织未出现明显出血点, 且胰腺相比对照组出现水肿或轻微水肿, 但未见明显坏死。

## 2.2 各组淀粉酶脂肪酶变化

AP 组血淀粉酶、脂肪酶水平显著高于对照组, ISO-1 组显著低于 AP 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

## 2.3 各组胰腺组织变化及评分

如图 1 所示, 相比对照组, 模型组胰腺组织有明显的小叶间隔和细胞间隙增宽、细胞呈现片状坏死和炎症细胞浸润。ISO-1 治疗组胰腺组织水肿坏死和炎症细胞浸润明显减轻。根据组织学评分分析发现, AP 模型组组织学评分明显高于 CON 组, 而 ISO-1 治疗组较 AP 模型组降低, 且差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 各组胰腺组织 MDA 和 SOD 水平

如表 2 所示, AP 组胰腺组织 MDA 水平高于对照组, SOD 水平显著低于对照组; 而 ISO-1 处理则降低了 MDA 水平和升高了 SOD 水平, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 2.5 胰腺组织 MIF 蛋白表达

AP 模型组 MIF 蛋白表达显著高于对照组, ISO-1 组显著低于 AP 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

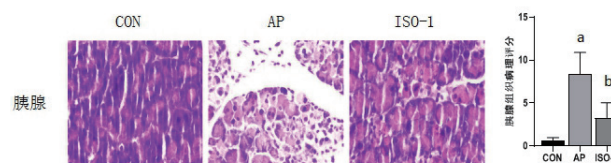
## 2.6 胰腺组织 NLRP3、IL-1 $\beta$ 蛋白表达

AP 模型组 NLRP3、IL-1 $\beta$  蛋白表达显著高于对照组, ISO-1 组显著低于 AP 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

表 1 血淀粉酶和脂肪酶水平 (Mean  $\pm$  SD,  $n=6$ )

组别	淀粉酶 (IU/L)	脂肪酶 (ng/mL)
CON 组	90.9 $\pm$ 25.42	24.88 $\pm$ 3.865
AP 组	255.8 $\pm$ 24.42 <sup>a</sup>	117.3 $\pm$ 27.67 <sup>a</sup>
ISO-1 组	143.8 $\pm$ 16.23 <sup>b</sup>	64.68 $\pm$ 5.258 <sup>b</sup>

注: 与 CON 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 AP 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$



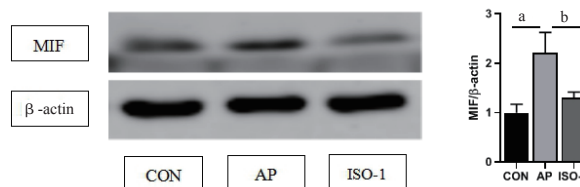
注: 与 CON 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 AP 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 1 胰腺组织病理学改变和病理评分

表 2 胰腺组织 MDA 和 SOD 水平 (Mean  $\pm$  SD,  $n=6$ )

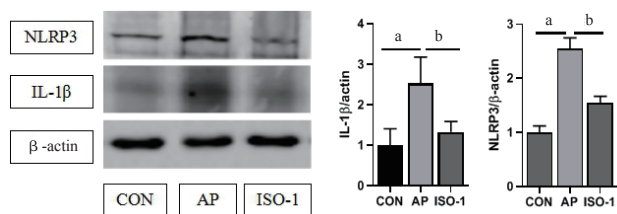
组别	SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
CON	44.14 $\pm$ 7.465	37.02 $\pm$ 4.013
AP	32.70 $\pm$ 4.352 <sup>a</sup>	104.3 $\pm$ 12.84 <sup>a</sup>
ISO-1	40.50 $\pm$ 5.915 <sup>b</sup>	64.55 $\pm$ 6.205 <sup>b</sup>

注: 与 CON 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 AP 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$



与 CON 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 AP 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$  ( $n=6$ )

图 2 胰腺组织中 MIF 蛋白表达



与 CON 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 AP 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$  ( $n=6$ )

图 3 胰腺组织中 NLRP3 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达

### 3 讨论

急性胰腺炎是一种急性无菌性炎症, 早期仅表现为胰腺局部损伤, 随着疾病进程可发展为全身炎症反应综合征, 并发胰腺外脏器损伤, 进展为 MODS。氧化应激反应在 AP 早期阶段胰腺组织局部损伤中发挥着重要作用<sup>[9]</sup>。在本研究中发现, AP 模型组中, 胰腺组织中 MDA 水平上升和 SOD 水平下降; 同样的有临床研究表明急性胰腺炎患者的血清 MDA 水平上升和 SOD 水平下降<sup>[9]</sup>, 而这与本实验结果一致。MIF 抑制剂 ISO-1, 作为一种小分子抑制剂被广泛应用于炎症性疾病研究; 在本研究中发现, ISO-1 除了对 AP 模型中的胰腺组织损伤具有保护作用, 而且具有抗氧化作用, 降低了急性胰腺炎胰腺组织中 MDA 水平并升高了 SOD 水平。多项研究证明, 抗氧化可以明显缓解急性胰腺炎动物模型的严重程度<sup>[11-14]</sup>, 因此笔者推测, ISO-1 可以通过抑制氧化应激反应对 AP 模型中胰腺组织损伤发挥保护作用。

ISO-1 除了能够抑制胰腺组织氧化应激外, 还可以抑制 NLRP3 炎症小体的激活。ISO-1 作为 MIF 的小分子抑制剂, 早在 2018 年被发现可以抑制 NLRP3 炎症小体的激活; 除此之外在该项研究中还发现 MIF 可能是作为 NLRP3 的分子伴侣, 而被 NLRP3 炎症小体激活所必需<sup>[15]</sup>。2020 年有研究发现在 AP 模型中, NLRP3 炎症小体可以调控全身炎症反应和代偿性抗炎反应综合征; 当使用 NLRP3 抑制剂和敲除 NLRP3 基因后减轻了 AP 模型中胰腺组织损伤<sup>[16]</sup>。因此推测 ISO-1 对胰腺组织发挥保护作用可能与 ISO-1 抑制 NLRP3 炎症小体激活有关。

在本研究中仅观察到 ISO-1 抑制胰腺组织氧化应激反应和 NLRP3 炎症小体激活, 未来需要进一步研究明确 ISO-1 是通过直接作用抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 还是通过抑制氧化应激间接作用于 NLRP3 炎症小体的激活。

### 参 考 文 献

[1] Boxhoorn L, Voermans RP, Bouwense SA, et al. Acute pancreatitis[J].

Lancet, 2020, 396(10252): 726-734. DOI:10.1016/s0140-6736(20)31310-6.

- [2] Petrov MS, Yadav D. Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(3): 175-184. DOI:10.1038/s41575-018-0087-5.
- [3] Al-Abed Y, VanPatten S. MIF as a disease target: ISO-1 as a proof-of-concept therapeutic[J]. Future Med Chem, 2011, 3(1): 45-63. DOI:10.4155/fmc.10.281.
- [4] Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, et al. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe Sepsis[J]. J Biol Chem, 2005, 280(44): 36541-36544. DOI:10.1074/jbc.c500243200.
- [5] Dagia NM, Kamath DV, Bhatt P, et al. A fluorinated analog of ISO-1 blocks the recognition and biological function of MIF and is orally efficacious in a murine model of colitis[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 607(1/2/3): 201-212. DOI:10.1016/j.ejphar.2009.02.031.
- [6] Cheng B, Wang QF, Song YD, et al. MIF inhibitor, ISO-1, attenuates human pancreatic cancer cell proliferation, migration and invasion in vitro, and suppresses xenograft tumour growth in vivo[J]. Sci Rep, 2020, 10: 6741. DOI:10.1038/s41598-020-63778-y.
- [7] Zhu C, Liu Y, Song Y, et al. Deletion of macrophage migration inhibitory factor ameliorates inflammation in mice model severe acute pancreatitis[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109919. DOI:10.1016/j.biopha.2020.109919.
- [8] 王万朋, 程波, 杨舒珺, 等. 敲除巨噬细胞移动抑制因子基因可减轻小鼠重症急性胰腺炎相关肺损伤 [J]. 中华急诊医学杂志, 2021,30(5).DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.05.008.
- [9] 张王军, 孙备, 王刚. 氧化应激与急性胰腺炎的研究进展 [J]. 国际外科学杂志, 2020(9): 644-648. DOI:10.3760/cma.j.cn115396-20191231-00247.
- [10] Ścisłalska M, Ołdakowska M, Marek G, et al. Changes in the activity and concentration of superoxide dismutase isoenzymes (cu/zn sod, mnsod) in the blood of healthy subjects and patients with acute pancreatitis.[J]. Antiox, 2020,9(10).DOI:10.3390/antiox9100948.
- [11] Abozaid OAR, Moawad FSM, Ahmed ESA, et al. Cinnamic acid nanoparticles modulate redox signal and inflammatory response in gamma irradiated rats suffering from acute pancreatitis[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(11): 165904. DOI:10.1016/j.bbdis.2020.165904.
- [12] 杨晓佳, 赵凯亮, 李满, 等. NADPH 氧化酶通过调节 Akt/GSK3 $\beta$  通路参与高脂血症急性胰腺炎大鼠胰腺损伤 [J]. 中华急诊医学杂志, 2019,28(12).DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.12.008.

(收稿日期: 2021-03-10)

(本文编辑: 何小军)