

网络出版时间:2024-12-05 14:12:07 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.003

# MIF 抑制剂 ISO-1 通过减轻氧化应激、炎症反应和细胞凋亡缓解脓毒症诱导的急性肾损伤

殷富康, 张晓霞, 杨小军, 李吉明

[新疆医科大学第一附属医院急救重症监护室(EICU), 乌鲁木齐 830054]

**摘要** 目的 探究巨噬细胞移动抑制因子(MIF)抑制剂(S,R)-3-(4-羟苯基)-4,5-二氢-5-异噁唑乙酸甲酯(ISO-1)对脓毒症诱导的急性肾损伤(AKI)的作用及相关机制。方法 将人肾小管上皮细胞系 HK-2 分为 Con 组(不做任何处理), ISO-1 组(10  $\mu\text{g/ml}$  ISO-1 处理 24 h), LPS 组(10  $\mu\text{g/ml}$  LPS 处理 24 h), LPS + ISO-1 组(10  $\mu\text{g/ml}$  LPS 处理 24 h 后加入 10  $\mu\text{g/ml}$  ISO-1 处理 24 h)。ELISA 检测各组细胞上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)含量;6-羧基-2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯荧光指示剂(DCFH-DA)法检测细胞中活性氧(ROS)含量变化,TUNEL 染色检测细胞凋亡,Western blot 检测细胞中核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、Kelch 样环氧丙烷相关蛋白 1(Keap1)、血红素加氧酶 1(HO-1)和凋亡相关蛋白 B 淋巴瘤瘤-2 基因产物(Bcl-2)、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bax)及裂解型半胱氨酸蛋白酶-3(c-caspase-3)的表达。采用盲肠结扎穿孔法(CLP)建立脓毒症小鼠模型,分为假手术(Sham)组,ISO-1 对照(ISO-1)组,盲肠结扎穿孔(CLP)组和 ISO-1 治疗(CLP + ISO-1)组。实验结束后,取小鼠肾组织进行 HE 染色观察各组小鼠肾组织病理改变,检测血尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)和肾组织中髓过氧化物酶(MPO)含量、谷胱甘肽(GSH)及超氧化物歧化酶(SOD)活性,并通过 Western blot 检测肾组织中上述 MIF 因子和 Nrf2/Keap1 信号通路和凋亡相关蛋白的表达。结果 与 Con 组相比,LPS 组和 LPS + ISO-1 组 HK-2 细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量、TUNEL 阳性率和细胞中 ROS 含量及 Keap1、Bax 与 c-Caspase-3 的蛋白表达均升高( $P < 0.05$ ),而 Nrf2、HO-1 和 Bcl-2 蛋白降低( $P < 0.05$ );ISO-1 组无明显变化( $P > 0.05$ )。与 LPS 组相比,LPS + ISO-1 组细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量、TUNEL 阳性率和细胞中 ROS 含量及 Keap1、Bax 与 c-Caspase-3 的蛋白表达均降低( $P < 0.05$ ),而 Nrf2、HO-1 和 Bcl-2 蛋白表达升高( $P < 0.05$ )。小鼠实验结果显示,与 Sham 组相比,CLP 组与 CLP + ISO-1 组小鼠肾组织损伤严重,血清 BUN、Scr 含量及肾组织中 MIF、Keap1、Bax 与 c-Caspase-3 蛋白表达升高( $P < 0.05$ ),而 GSH、SOD 活性及 Nrf2、HO-1、Bcl-2 蛋白表达降低( $P < 0.05$ );ISO-1 组无明显变化( $P > 0.05$ );与 CLP 组相比,CLP + ISO-1 组上述指标改善( $P < 0.05$ )。结论 MIF 特异性抑制剂 ISO-1 可能在体内外通过 Nrf2/Keap1 信号通路抑制氧化应激、炎症反应和细胞凋亡,改善脓毒症诱导的 AKI。

**关键词** 脓毒症;急性肾损伤;巨噬细胞移动抑制因子拮抗剂 ISO-1;氧化应激;炎症;细胞凋亡

**中图分类号** R 73;R 914

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2079-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.003

近年来,尽管抗生素广泛应用以及对症支持治疗普及,脓毒症依然是重症监护病房(intensive care units, ICU)中死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。据统计,我国 ICU 中脓毒症患者的病死率为 35.5%,而累及器官功能障碍的重症脓毒症患者的病死率则高达 50%以上,严重威胁着患者的生命和健康<sup>[1]</sup>。急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是重症脓毒症最常见和最主要的并发症之一,然而,目前尚无有效的治疗方法,这可能与其病理生理机制尚未完全阐明有

关<sup>[2]</sup>。研究<sup>[2]</sup>表明,脓毒症诱导的 AKI 发病机制复杂,主要包括炎症损伤、氧化应激和细胞凋亡等。其中,氧化应激与炎症反应相互促进,在 AKI 中起着重要作用<sup>[3]</sup>。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)作为一种多功能的促炎因子,已被证明是脓毒症的生物标志物<sup>[4]</sup>。(S,R)-3-(4-羟苯基)-4,5-二氢-5-异噁唑乙酸甲酯[(S,R)-3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid, ISO-1]是 MIF 特异性抑制剂,已被证明可通过抑制氧化应激和炎症反应在缺血性脑损伤和缺血/再灌注肝损伤中发挥保护作用<sup>[5]</sup>。然而,外源性给予 ISO-1 是否能够缓解脓毒症 AKI 尚不清楚。该研究旨在通过体内外实验探讨 ISO-1 缓解脓毒症 AKI 的疗效及其作用机制。

2024-10-11 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(编号:2020D01C236)

作者简介:殷富康,男,硕士,医师;

李吉明,男,硕士,副主任医师,通信作者, E-mail: 260774208@qq.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 细胞系和实验动物** 人肾小管上皮细胞系 HK-2(中国科学院上海细胞库,货号:SCSP-5207)。40 只 8 周龄雄性 C57B6 小鼠购自新疆医科大学实验动物中心,体质量 22 ~ 25 g,饲养于恒温(22 ~ 25 ℃)、恒湿(55% ~ 75%)、配备 12 h/12 h 光照/黑暗循环的标准 SPF 级鼠房。小鼠饲喂标准啮齿类动物饲料,可以自由采食和饮水。适应性饲养一周。所有动物实验均经本院伦理委员会批准(伦理号: IACUC20200318-14)

**1.1.2 主要试剂和仪器** CCK-8 细胞增殖检测试剂盒(货号:96992)、6-羧基-2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯荧光指示剂(DCFH-DA)试剂盒(货号: D6883)、TUNEL 凋亡检测试剂盒(货号:QIA33)(美国 Sigma-Aldrich 公司)。DMEM 培养基(货号: SH30021.01)、胎牛血清(货号:SH30406.02)(美国 Hyclone 公司)。青-链霉素混合液(美国 Gibco 公司,货号:15140-122);脂多糖(lipolysaccharide, LPS)(美国 Invitrogen 公司,货号:00-4976-93)。肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )(货号: QTA00C)、白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ (货号: QLB00B)和 IL-6(货号:Q6000B)ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)。血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)(货号:C013-2-1)、肌酐(serum creatinine, Scr)(货号:C011-2-1)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)(货号:A044-1-1)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)(货号:A005-1-2)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)(货号:A001-3-1)的商品化检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司)。ISO-1(货号:S7732,美国 Selleck 公司)。苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)试剂盒(货号:C0105)、RIPA 裂解液(货号:P0013B)(上海碧云天生物科技有限公司)。BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司,货号:23225)。兔抗 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Kelch-like epichlorohydrin associated protein 1, Keap1)(货号:8047)、核转录因子 E2 相关因子 2(nuclear erythroid 2-related factor, Nrf2)(货号: 12721)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase 1, HO-1)(货号:43966)、MIF(货号:87501)、B 细胞淋巴瘤相关蛋白-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)(货号:4223)、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bcl-2 is associated with X protein, Bax)(货号:5023)和裂解型半胱氨酸蛋白酶-3

(cleaved Caspase-3, c-Caspase-3)(货号:9579)及 GAPDH(货号:2118)单克隆抗体,山羊抗兔二抗(货号:7074)(美国 CST 公司)。Eclipse Ti-s 型荧光显微镜(日本 Nikon 公司),F50 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 细胞分组、处理和细胞增殖实验** 细胞实验 1:HK-2 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。将生长状态良好的 HK-2 细胞按  $1 \times 10^4$  个/孔接种至 96 孔板中,培养贴壁后,加入不同浓度的 LPS(0、0.1、1、5、10、50、100  $\mu\text{g/ml}$ )刺激 24 h,每个浓度设置 5 个复孔,0  $\mu\text{g/ml}$  LPS 处理的细胞作为对照组。刺激结束后,每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 试剂,孵育 2 h 后,在 450 nm 波长处检测吸光度值。细胞实验 2:选择 10  $\mu\text{g/ml}$  的 LPS 与不同浓度的 ISO-1(0、0.1、1、5、10、50、100  $\mu\text{g/ml}$ )继续处理 HK-2 细胞 24 h,并以 10  $\mu\text{g/ml}$  的 LPS 和 0  $\mu\text{g/ml}$  ISO-1 联合处理的细胞为对照组(Con 组)。按上述方法检测每孔 450 nm 波长处吸光度值,计算细胞增殖率。细胞实验 3:将细胞分为 Con 组(不做任何处理),ISO-1 组(10  $\mu\text{g/ml}$  ISO-1 处理 24 h),LPS 组(10  $\mu\text{g/ml}$  LPS 处理 24 h),LPS + ISO-1 组(10  $\mu\text{g/ml}$  LPS 处理 24 h 后加入 10  $\mu\text{g/ml}$  ISO-1 处理 24 h),作为后续细胞实验分组。

**1.2.2 ELISA 实验** 收集各组细胞培养上清液,2 000 r/min 离心 15 min 后取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的分泌水平。

#### 1.2.3 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测

按  $5 \times 10^5$  个/孔接种 HK-2 细胞至 12 孔板中,待细胞贴壁后按细胞实验 3 要求处理细胞。弃去培养液,DMEM 洗涤细胞后,每孔加入 10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA 试剂,37 ℃ 避光孵育 45 min,再次用 DMEM 洗涤。荧光显微镜下观察细胞中 ROS 的绿色荧光量。

**1.2.4 TUNEL 检测细胞凋亡** 各组细胞固定于 4% 多聚甲醛溶液中 30 min,70% 预冷乙醇溶液中固定 15 min 后,PBS 中透化 5 min,加入 TUNEL 试剂 37 ℃ 避光染色 1 h。PBS 洗涤后,加入抗荧光猝灭封闭液,荧光显微镜下观察,用 DAPI 染色细胞核,计算凋亡率。凋亡率 = TUNEL 阳性细胞数(绿色)/总细胞数(蓝色)  $\times 100\%$ 。

**1.2.5 小鼠分组和建模** 将小鼠随机分为假手术组(Sham 组)、ISO-1 对照组(ISO-1 组)、盲肠结扎穿刺组(CLP 组)和 ISO-1 治疗组(CLP + ISO-1 组)(每

组 10 只)。参考文献<sup>[6]</sup>通过盲肠结扎穿刺法建立脓毒症小鼠模型。ISO-1 组和 CLP + ISO-1 组在术前 6 h 和术后每 12 h, 按 3.5 mg/kg 经腹腔注射 ISO-1 溶液, Sham 组和 CLP 组注射等体积的 DMSO 溶液。术后 72 h 采集血液样本, 颈椎脱臼法处死小鼠, 取双侧肾组织, 一侧固定于 4% 甲醛溶液中用于病理学检测, 一侧用于生化检测和蛋白提取。

**1.2.6 HE 染色观察小鼠肾组织病理学改变** 取固定于 4% 甲醛溶液中的肾组织, 石蜡包埋后切片至 5  $\mu\text{m}$ , 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 使用 HE 试剂盒进行染色后于倒置显微镜下观察拍照。

**1.2.7 生化检测** 随机选取各组 5 只小鼠的血液标本, 静置后取上层血清, 按试剂盒说明书检测 BUN 和 Scr 含量。取肾组织匀浆, 溶解于提取缓冲液中, 按试剂盒说明书测定 GSH、MPO 和 SOD 活性。

**1.2.8 Western blot 实验** 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液, 在液氮中研磨肾脏组织制备组织匀浆, 并提取总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。10% SDS-PAGE 分离蛋白样品, 电泳转膜至 PVDF 膜, 5% 牛血清白蛋白封闭。然后, 加入稀释后的一抗: MIF (1 : 1 000)、Keap1 (1 : 1 000)、Nrf2 (1 : 1 000)、HO-1 (1 : 1 000)、Bcl-2 (1 : 1 000)、Bax (1 : 1 000)、c-Caspase-3 (1 : 1 000) 和 GAPDH (1 : 2 000), 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜, 次日加入山羊抗兔二抗 (1 : 3 000)。滴加增强型化学发光液在电化学发光系统中进行蛋白质条带显影。以 GAPDH 条带灰度

为内参, ImageJ 软件分析目的蛋白质条带的灰度值。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad 7.0 软件进行统计分析, 所有数据均以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组间均数比较采用 *t* 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 事后组间两两比较采用 Tukey 多重比较进行分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ISO-1 对 LPS 诱导 HK-2 细胞损伤的保护作用** CCK-8 法检测结果显示, 与 Con 组 (0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 相比, 1、5、10、50、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 LPS 刺激时 HK-2 细胞增殖率降低 ( $F = 760.7, P < 0.0001$ ; Tukey 检验均  $P < 0.05$ ) (见图 1A); Western blot 检测结果显示, 与 Con 组 (0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 相比, 随 LPS 浓度的增加 (1、5、10、50、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), HK-2 细胞中 MIF 蛋白表达水平升高 (均  $P < 0.05$ ) ( $F = 42.4, P < 0.0001$ , Tukey 检验均  $P < 0.05$ ), 并在 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 LPS 刺激时达到峰值 (图 1B), 因此选择以 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS 刺激 24 h 为适宜条件。CCK-8 检测 ISO-1 对 LPS 刺激下 HK-2 细胞增殖率影响, 结果显示, 与 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组相比, 5、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 ISO-1 可提升 HK-2 细胞的增殖率, 且以 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 ISO-1 作用最为明显, 而 50、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 ISO-1 则降低 HK-2 细胞的增殖率 ( $F = 91.4, P < 0.0001$ , Tukey 检验均  $P < 0.05$ ) (见图 1C)。因此, 选择 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS 与 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 ISO-1

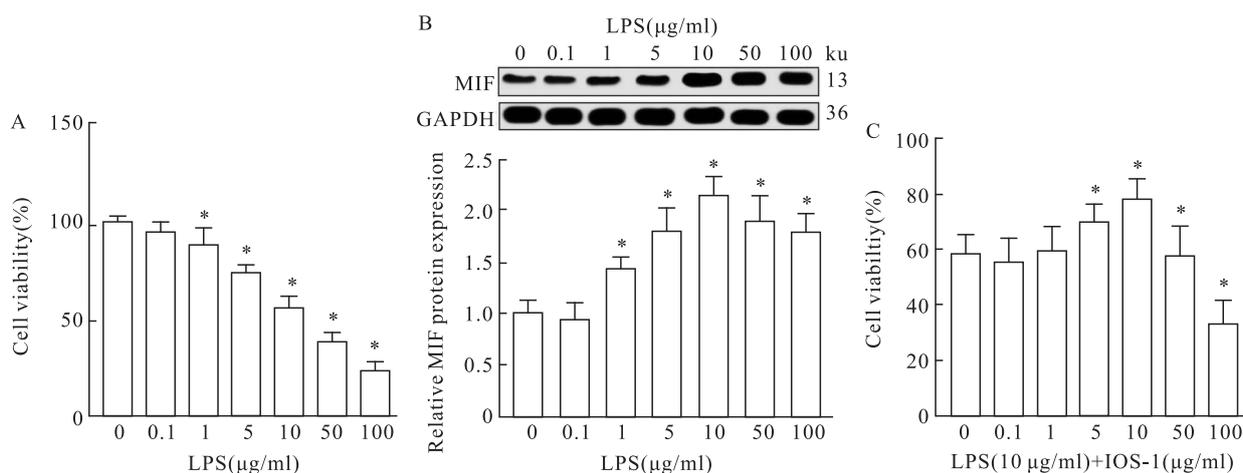


图 1 ISO-1 改善 LPS 诱导的 HK-2 细胞损伤

Fig. 1 ISO-1 alleviated LPS-induced HK-2 cell injury

A: The effects of different concentrations of LPS on the proliferation ability of HK-2 cells detected by CCK-8; B: The effects of different concentrations of LPS on the expression of MIF in HK-2 cells detected by Western blot; C: The effects of different concentrations of ISO-1 on the proliferation ability of HK-2 cells treated with LPS detected by CCK-8; \*  $P < 0.05$  vs 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

进行后续实验。

**2.2 各组 HK-2 细胞中炎症因子分泌、活性氧表达和细胞的凋亡水平** LPS 组和 LPS + ISO-1 组 HK-2 TNF- $\alpha$  ( $F = 588.7, P < 0.0001$ )、IL-1 $\beta$  ( $F = 911.0, P < 0.0001$ )、IL-6 ( $F = 1807.0, P < 0.0001$ ) 含量、ROS 水平 ( $F = 196.2, P < 0.0001$ ) 以及 TUNEL 细胞阳性率 ( $F = 58.6, P < 0.0001$ ) 与 Con 组相比均明显升高 (Tukey 检验均  $P < 0.05$ ), ISO-1 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 LPS 组相比, LPS + ISO-1 组 HK-2 细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量、ROS 水平

以及 TUNEL 细胞阳性率均降低 (Tukey 检验均  $P < 0.05$ ) (见图 2)。提示 ISO-1 能够降低 LPS 诱导的 HK-2 细胞的炎症因子水平、氧化应激和细胞凋亡水平。

**2.3 各组 HK-2 细胞中 Nrf2/Keap1 信号通路和凋亡相关蛋白的表达** Western blot 检测各组 HK-2 细胞中 Nrf2/Keap1 信号通路中 Keap1 ( $F = 144.2, P < 0.0001$ )、Nrf2 ( $F = 113.1, P < 0.0001$ )、HO-1 ( $F = 83.5, P < 0.0001$ ) 和凋亡相关蛋白 Bcl-2 ( $F = 150.5, P < 0.0001$ )、Bax ( $F = 186.5, P < 0.0001$ )

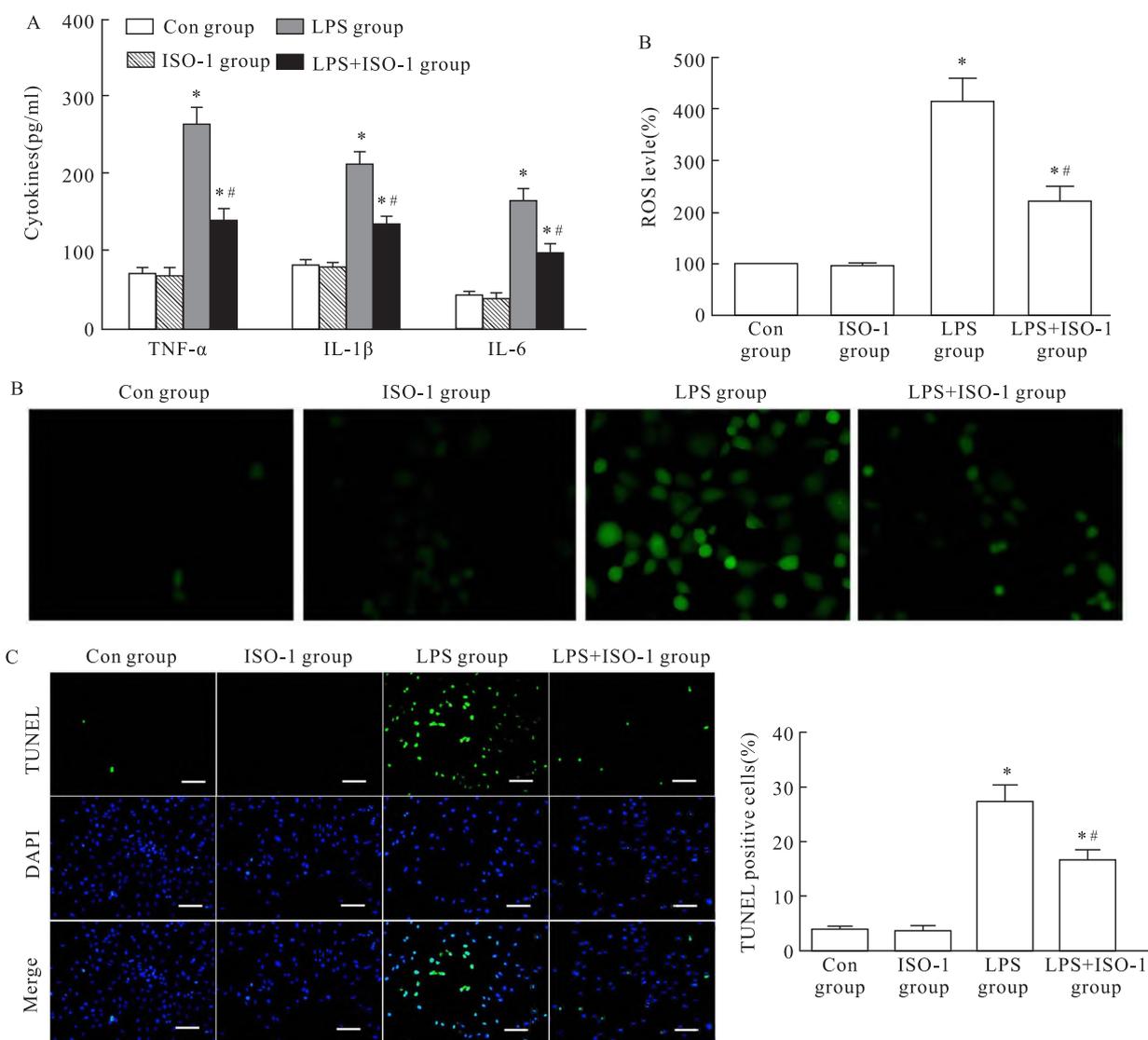


图 2 LPS 和 ISO-1 处理对 HK-2 细胞炎症水平、氧化应激和细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of LPS and ISO-1 treatment on inflammation, oxidative stress and apoptosis of HK-2 cells

A: The levels of inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in HK-2 cell supernatants were determined by ELISA; B: ROS levels in each group of HK-2 cells detected by DCFH-DA method  $\times 400$ ; C: The percentage of TUNEL apoptotic cells of HK-2 cells in each group were determined by TUNEL staining  $\times 100$ ; \*  $P < 0.05$  vs Con group; #  $P < 0.05$  vs LPS group.

与 c-Caspase-3 ( $F = 141.7, P < 0.0001$ ) 的蛋白表达,结果显示,与 Con 组相比,LPS 组和 LPS + ISO-1 组中 Nrf2、HO-1 和 Bcl-2 蛋白表达降低(Tukey 检验均  $P < 0.05$ ),Keap1、Bax 与 c-Caspase-3 蛋白表达升高(Tukey 检验均  $P < 0.05$ ),ISO-1 组无明显改变( $P > 0.05$ );与 LPS 组相比,LPS + ISO-1 组中 Nrf2、HO-1、Bcl-2 蛋白表达升高(Tukey 检验均  $P < 0.05$ ),而 Keap1、Bax 与 c-Caspase-3 蛋白表达降低(Tukey 检验均  $P < 0.05$ )(图 3),提示 ISO-1 能够降低 LPS 诱导的 HK-2 细胞内 Nrf2/Keap1 信号通路和凋亡相关蛋白的活化水平。

**2.4 ISO-1 改善 CLP 诱导的小鼠肾损伤** 各组小鼠肾组织 HE 染色结果显示,Sham 组与 ISO-1 组小鼠肾小球结构完整,而 CLP 组小鼠肾小球细胞损伤严重,炎症细胞浸润,刷状缘消失,肾小管细胞空泡化,CLP + ISO-1 组小鼠肾组织损伤较 CLP 组明显减轻(图 4)。与 Sham 组相比,CLP 组和 CLP + ISO-1 组小鼠血清 BUN ( $F = 235.9, P < 0.0001$ )、Scr ( $F = 86.8, P < 0.0001$ ) 浓度(Tukey 检验均  $P < 0.05$ )及

肾组织 MPO ( $F = 149.8, P < 0.0001$ ) 含量明显升高(Tukey 检验均  $P < 0.05$ ),肾组织 GSH ( $F = 527.1, P < 0.0001$ ) 和 SOD ( $F = 183.5, P < 0.0001$ ) 含量减少(Tukey 检验均  $P < 0.05$ ),ISO-1 组差异无统计学意义(Tukey 检验均  $P > 0.05$ );与 CLP 组相比,CLP + ISO-1 组小鼠血清 BUN 和 Scr 浓度(Tukey 检验均  $P < 0.05$ )及肾组织 MPO 含量( $P < 0.05$ )降低,而 GSH 和 SOD 活性增加(Tukey 检验均  $P < 0.05$ )。提示 ISO-1 能够降低 CLP 组的氧化应激和肾损伤。

**2.5 各组小鼠肾组织中 MIF、Nrf2/Keap1 信号通路和凋亡相关蛋白的表达** Western blot 检测结果显示,与 Sham 组相比,CLP 组和 CLP + ISO-1 组中 Nrf2 ( $F = 213.5, P < 0.0001$ )、HO-1 ( $F = 171.7, P < 0.0001$ ) 和 Bcl-2 ( $F = 124.2, P < 0.0001$ ) 蛋白表达降低(Tukey 检验均  $P < 0.05$ ),MIF ( $F = 85.4, P < 0.0001$ )、Keap1 ( $F = 272.5, P < 0.0001$ )、Bax ( $F = 52.1, P < 0.0001$ ) 和 c-Caspase-3 ( $F = 239.9, P < 0.0001$ ) 蛋白表达升高(Tukey 检验均  $P < 0.05$ ),

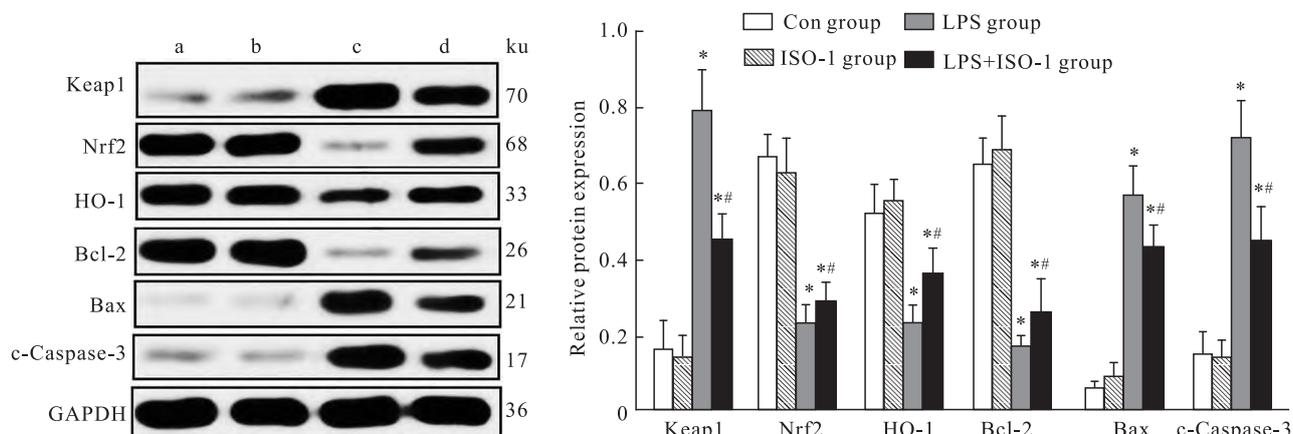


图 3 Western blot 检测各组 HK-2 细胞 Nrf2/Keap1 信号通路和凋亡相关蛋白的表达

Fig. 3 Nrf2/Keap1 signaling pathway and apoptosis-related protein expression levels in each group of HK-2 cells detected by Western blot

a: Con group; b: ISO-1 group; c: LPS group; d: LPS + ISO-1 group; a: Con group; b: ISO-1 group; c: LPS group; d: LPS + ISO-1 group; \*  $P < 0.05$  vs Con group; #  $P < 0.05$  vs LPS group.

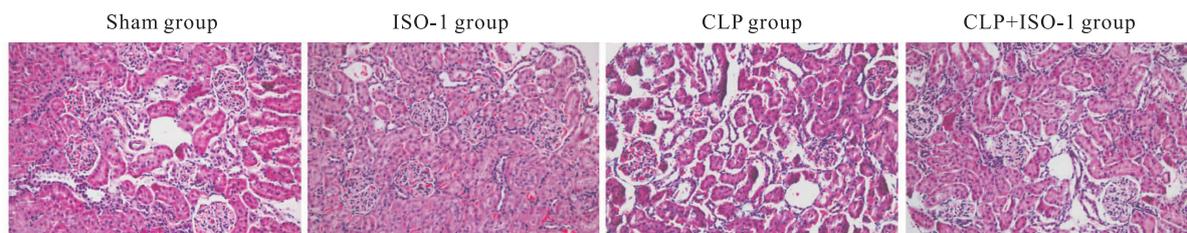


图 4 HE 染色观察各组小鼠肾组织病理学改变  $\times 200$

Fig. 4 Histopathological changes of each group of mice renal determined by HE staining  $\times 200$

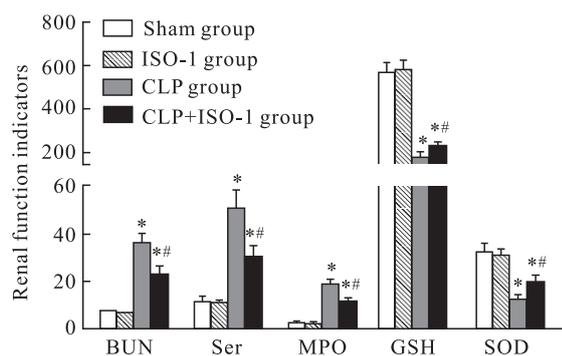


图5 各组小鼠血清 BUN、Scr 含量和肾组织中 MPO 含量和 GSH、SOD 活性的比较

Fig. 5 Comparison of serum BUN and Scr concentration, and MPO levels as well as GSH and SOD activities in different groups of mice renal tissues

\*  $P < 0.05$  vs Sham group; #  $P < 0.05$  vs CLP group.

ISO-1 组差异无统计学意义 (Tukey 检验  $P > 0.05$ ); 与 CLP 组相比, CLP + ISO-1 组中 Nrf2、HO-1、Bcl-2 蛋白表达升高 (Tukey 检验  $P < 0.05$ ), 而 MIF、Keap1、Bax 与 c-Caspase-3 蛋白表达降低 (Tukey 检验  $P < 0.05$ )。见图 6。

### 3 讨论

既往研究<sup>[7]</sup>表明,抑制氧化应激和细胞凋亡可以改善脓毒症诱导的肾组织中的炎症损伤。具有抗炎活性的药物可通过下调氧化应激和炎症反应来保护脓毒症诱导的器官功能障碍<sup>[7]</sup>。本研究结果显示, MIF 特异性抑制剂 ISO-1 在体内外可能通过 Nrf2/Keap1 信号通路抑制氧化应激、炎症反应和细

胞凋亡,从而改善脓毒症诱导的 AKI,这与之前报道的 ISO-1 通过抑制 NLRP3 缓解急性胰腺炎致急性肾损伤的结果类似<sup>[8]</sup>。

MIF 作为一种促炎因子,大量储存于单核/巨噬细胞中,能被低浓度的 LPS 触发从胞内分泌至循环系统中,进一步激活炎症途径,诱导免疫细胞分化并募集至炎症区域<sup>[9]</sup>。在脓毒症中, MIF 可在早期迅速升高并诱导内皮细胞损伤,加剧疾病进展,具有作为脓毒症诊断生物标志物的潜在价值<sup>[10]</sup>。ISO-1 作为 MIF 的特异性抑制剂,通过抑制 MIF 的活性功能可有效治疗多种炎症性疾病,如脓毒症诱导的急性胰腺炎和缺血再灌注导致的肝损伤等<sup>[11-12]</sup>。在肾组织中, MIF 含量丰富,参与调控多种急慢性肾脏疾病,如慢性肾脏疾病、肾小球肾炎、多囊肾、AKI 和糖尿病肾病等<sup>[13]</sup>。既往使用抗 MIF 抗体疗法或 MIF 缺陷小鼠的研究<sup>[13-14]</sup>证明,抑制 MIF 活性有利于抑制肾脏炎症及组织损伤。本研究通过 LPS 刺激 HK-2 细胞后显示, LPS 可升高细胞中 ROS 含量,而 ISO-1 能降低 LPS 诱导的 ROS 和炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的升高;此外, LPS 促进了 HK-2 细胞的凋亡,而 ISO-1 能明显抑制这一作用;在 CLP 诱导的脓毒症小鼠模型中, ISO-1 显著改善了肾组织病理损伤、氧化应激水平和炎症反应。

氧化应激在 AKI 中起着至关重要的作用,能够直接诱导 ROS 和 NADPH 氧化酶的产生, ROS 在肾脏组织中含量丰富,并参与诱导肾组织结构损伤与功能障碍<sup>[15]</sup>。Nrf2 是氧化应激中的关键核因子,起着重要的保护作用。在生理条件下, Nrf2 与其抑制

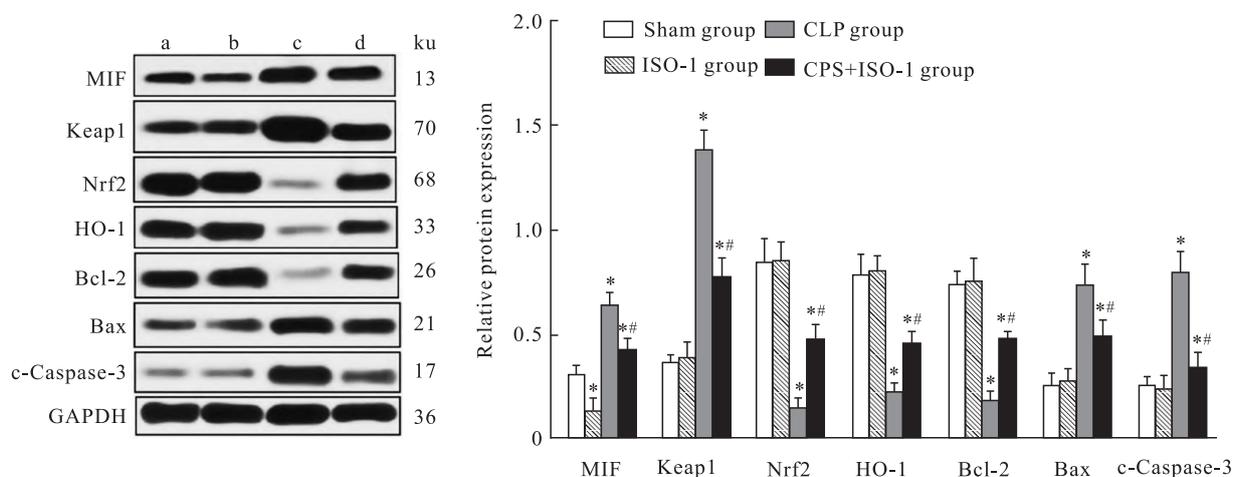


图6 Western blot 检测各组小鼠肾组织中 Nrf2/Keap1 信号通路和凋亡相关蛋白的表达

Fig. 6 Nrf2/Keap1 signaling pathway and apoptosis-related protein expression levels in each group of mice renal tissues determined by Western blot

a: Sham group; b: ISO-1 group; c: CLP group; d: CLP + ISO-1 group; \*  $P < 0.05$  vs Sham group; #  $P < 0.05$  vs CLP group.

剂 Keap1 结合,保存在细胞质中。当氧化应激发生时,Keap1 释放 Nrf2,Nrf2 移位到细胞核,激活抗氧化反应元件,启动细胞防御机制<sup>[16]</sup>。研究<sup>[17]</sup>表明,当 AKI 发生时,Nrf2/Keap1 信号通路被抑制,导致氧化应激加剧。而一些抗炎物质可通过激活 Nrf2/Keap1 信号改善 AKI<sup>[18]</sup>。本研究显示,在 LPS 刺激的 HK-2 细胞与 CLP 诱导的 AKI 小鼠模型中,Nrf2/Keap1 信号通路被抑制,而 ISO-1 可激活该通路,降低 Keap1 蛋白表达,并促进 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平。此外,ISO-1 还可降低促凋亡蛋白 Bax 和 c-Caspase3 水平,提升凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达,改善脓毒症诱导的肾组织/细胞损伤。

本研究结果提示 ISO-1 能够激活 Nrf2/Keap1 信号通路并能够抑制氧化应激、炎症反应和细胞凋亡,在脓毒症 AKI 中起到缓解疾病进展的作用。这一发现为 MIF 特异性抑制剂在脓毒症 AKI 治疗中的应用提供了新的理论依据。然而,本研究存在一些局限性。首先,尽管结果具有统计学显著性,但样本量有限,需进行更大样本量的验证研究。其次,ISO-1 缓解脓毒症 AKI 的分子机制仍需进一步深入探讨。此外,本研究主要基于细胞和小鼠模型,临床应用的可行性和安全性尚需进一步研究。

综上所述,研究表明 MIF 特异性抑制剂 ISO-1 通过改善氧化应激和细胞凋亡途径,在体内外对脓毒症诱导的 AKI 具有保护作用。这一发现为脓毒症 AKI 的治疗提供了新的思路和潜在的治疗策略。

### 参考文献

- [1] Xie J, Wang H, Kang Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey [J]. Crit Care Med, 2020, 48 (3): e209 - 18. doi: 10.1097/CCM.0000000000004155.
- [2] Manrique-Caballero C L, Del Rio-Pertuz G, Gomez H. Sepsis-associated acute kidney injury [J]. Crit Care Clin, 2021, 37(2): 279 - 301. doi: 10.1016/j.ccc.2020.11.010.
- [3] Ow C P C, Trask-Marino A, Betrie A H, et al. Targeting oxidative stress in septic acute kidney injury: from theory to practice [J]. J Clin Med, 2021, 10 (17): 3798. doi: 10.3390/jcm10173798.
- [4] Toldi J, Kelava L, Marton S, et al. Distinct patterns of serum and urine macrophage migration inhibitory factor kinetics predict death in sepsis: a prospective, observational clinical study [J]. Sci Rep, 2023, 13(1):588. doi: 10.1038/s41598-023-27506-6.
- [5] Li Y, Zou C, Chen C, et al. Myeloid-derived MIF drives RIPK1-mediated cerebrovascular endothelial cell death to exacerbate ischemic brain injury [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(5):e2219091120. doi: 10.1073/pnas.2219091120.
- [6] Xie S, Li J, Lyu F, et al. Novel tripeptide RKH derived from *Akkermansia muciniphila* protects against lethal sepsis [J]. Gut, 2023, 73(1):78 - 91. doi: 10.1136/gutjnl-2023-329996.
- [7] Joffre J, Hellman J. Oxidative stress and endothelial dysfunction in sepsis and acute inflammation [J]. Antioxid Redox Signal, 2021, 35(15):1291 - 307. doi: 10.1089/ars.2021.0027.
- [8] Liu Y, Liu Y, Wang Q, et al. MIF inhibitor ISO-1 alleviates severe acute pancreatitis-associated acute kidney injury by suppressing the NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 96:107555. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107555.
- [9] Jalce G, Guignabert C. Multiple roles of macrophage migration inhibitory factor in pulmonary hypertension [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2020, 318(1):L1 - 9. doi:10.1152/ajplung.00234.2019.
- [10] Toldi J, Nemeth D, Hegyi P, et al. Macrophage migration inhibitory factor as a diagnostic and predictive biomarker in sepsis: meta-analysis of clinical trials [J]. Sci Rep, 2021, 11(1):8051. doi:10.1038/s41598-021-87613-0.
- [11] Zhou Y, Zhao L, Mei F, et al. Macrophage migration inhibitory factor antagonist (S,R)3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid methyl ester attenuates inflammation and lung injury in rats with acute pancreatitis in pregnancy [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5):6576 - 84. doi: 10.3892/mmr.2018.8672.
- [12] Ohkawara T, Okubo N, Maehara O, et al. Protective effect of ISO-1 with inhibition of RIPK3 up-regulation and neutrophilic accumulation on acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. Toxicol Lett, 2021, 339:51 - 9. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.12.015.
- [13] Kong Y Z, Chen Q, Lan H Y. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a stress molecule in renal inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9):4908. doi: 10.3390/ijms23094908.
- [14] Li J H, Tang Y, Lv J, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes renal injury induced by ischemic reperfusion [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(6):3867 - 77. doi:10.1111/jcmm.14234.
- [15] Daenen K, Andries A, Mekahli D, et al. Oxidative stress in chronic kidney disease [J]. Pediatr Nephrol, 2019, 34(6):975 - 91. doi: 10.1007/s00467-018-4005-4.
- [16] Tanase D M, Gosav E M, Anton M I, et al. Oxidative stress and NRF2/KEAP1/ARE pathway in diabetic kidney disease (DKD): new perspectives [J]. Biomolecules, 2022, 12(9):1227. doi: 10.3390/biom12091227.
- [17] Wei W, Ma N, Fan X, et al. The role of Nrf2 in acute kidney injury: novel molecular mechanisms and therapeutic approaches [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 158:1 - 12. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.025.
- [18] Hassanein E H M, Shalkami A S, Khalaf M M, et al. The impact of Keap1/Nrf2, P<sub>38</sub> MAPK/NF- $\kappa$ B and Bax/Bcl2/caspase-3 signaling pathways in the protective effects of berberine against meth-

## MIF inhibitor ISO-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis

Yin Fukang, Zhang Xiaoxia, Yang Xiaojun, Li Jiming

(Emergency Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054)

**Abstract Objective** To investigate the effects and underlying mechanisms of the macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitor (S, R)-3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid methyl ester (ISO-1) on sepsis-induced acute kidney injury (AKI). **Methods** Human renal tubular epithelial HK-2 cells were divided into Con group (without any treatment), ISO-1 group (10  $\mu\text{g/ml}$  ISO-1 treatment for 24 h) and LPS group (10  $\mu\text{g/ml}$  LPS treatment for 24 h), LPS + ISO-1 group (10  $\mu\text{g/ml}$  LPS treatment for 24 h followed by 10  $\mu\text{g/ml}$  ISO-1 treatment for 24 h). ELISA was used to measure the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-6 (IL-6) in the cell supernatants. Reactive oxygen species (ROS) levels were assessed using the 6-carboxyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate fluorescent indicator (DCFH-DA) method. Apoptosis levels were detected by TUNEL staining, and Western blot was employed to analyze the expression of proteins of Kelch like ECH associated protein 1 (Keap1), NFE2 like bZIP transcription factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), as well as apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, and cleaved Caspase-3 (c-Caspase-3). A sepsis mouse model was established using the cecal ligation and puncture (CLP) method, and the mice were divided into four groups: sham-operated (Sham), ISO-1 control (ISO-1), CLP, and ISO-1 treatment (CLP + ISO-1). After the experiment, mouse kidney tissues were collected for HE staining to observe pathological changes. Blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), myeloperoxidase (MPO) levels in kidney tissues, glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) activities were measured. Western blot was also used to detect the expression of MIF and proteins in the Nrf2/Keap1 signaling pathway and apoptosis-related proteins in kidney tissues. **Results** Compared to the Con group, the LPS and LPS + ISO-1 groups showed significantly increased levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TUNEL-positive rates, ROS levels, and protein expressions of Keap1, Bax, and c-Caspase-3 in HK-2 cells ( $P < 0.05$ ), while the expressions of Nrf2, HO-1, and Bcl-2 significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The ISO-1 group showed no significant changes ( $P > 0.05$ ). Compared to the LPS group, the LPS + ISO-1 group exhibited significantly decreased levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TUNEL-positive rates, ROS levels, and protein expressions of Keap1, Bax, and c-Caspase-3, while the expressions of Nrf2, HO-1, and Bcl-2 significantly increased ( $P < 0.05$ ). In the mouse experiments, compared to the Sham group, the CLP and CLP + ISO-1 groups showed severe kidney tissue damage, increased levels of serum BUN, Scr, and kidney MIF, Keap1, Bax, and c-Caspase-3 protein expressions ( $P < 0.05$ ), while GSH, SOD activities, and protein expressions of Nrf2, HO-1, and Bcl-2 significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The ISO-1 group showed no significant changes ( $P > 0.05$ ). Compared to the CLP group, the CLP + ISO-1 group showed significant improvements in the aforementioned indicators ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The specific MIF inhibitor ISO-1 can ameliorate sepsis-induced AKI by inhibiting oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis both *in vitro* and *in vivo*. The mechanism may be through Nrf2/Keap1 signaling pathway.

**Key words** sepsis; acute kidney injury; macrophage migration inhibitor antagonist ISO-1; oxidative stress; inflammation; apoptosis

**Fund program** Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2020D01C236)

**Corresponding author** Li Jiming, E-mail: 260774208@qq.com