

肝素结合蛋白通过弹性蛋白酶 - 焦亡相关蛋白 GSDMD 途径介导细胞焦亡加重急性胰腺炎早期胰腺损伤

吴婧 陈建军 李迎宾 杨宠玉 吴徐峰 周亮亮

盐城市第一人民医院急诊医学科危重症监护病区, 江苏盐城 224000

通信作者: 周亮亮, Email: zholia@126.com

【摘要】目的 探讨肝素结合蛋白(HBP)通过中性粒细胞丝氨酸蛋白酶弹性蛋白酶(ELANE)-焦亡相关蛋白 GSDMD 途径介导 M1 巨噬细胞焦亡在急性胰腺炎(AP)早期胰腺损伤的作用机制。**方法** 选择 108 只健康雄性野生型 BL/C57、条件性基因(-/-ELANE、-/-caspase-1)敲除小鼠,按随机数字表法分为正常对照组、AP 模型组、肝素组、ELANE 抑制剂组、ELANE 过表达组、ELANE 基因敲除组、caspase-1 基因敲除组、caspase-1 基因敲除且 ELANE 过表达组等。采用胰胆管逆行注射 0.5 mL 5% 胆酸的方法诱导 AP 小鼠模型,正常对照组给予等量生理盐水逆行注射。肝素组于制模后立即尾静脉注射肝素 100 U/kg, ELANE 抑制剂组于制模前 30 min 腹腔注射 ELANE 抑制剂 MK0339 10 mg/kg, ELANE 过表达组于制模前 30 min 尾静脉注射 ELANE 慢病毒载体。于制模后 48 h 处死小鼠,采集胰腺组织,光镜下观察胰腺组织病理学改变,并进行胰腺组织病理学损伤评分;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)和荧光定量反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测胰腺组织中相关蛋白和 mRNA 表达水平,以探究 HBP 对巨噬细胞极化和焦亡的影响。**结果** AP 模型组小鼠胰腺组织中 HBP 蛋白表达水平和组织病理学损伤评分均随制模后时间延长而逐渐升高,于 48 h 达到高峰,此后开始下降,制模后 72 h、96 h 仍明显高于制模后 6 h 水平(灰度值: 5.017 ± 0.147 、 2.750 ± 0.351 比 1.055 ± 0.145 , 均 $P < 0.05$)。正常对照组胰腺组织中 HBP、ELANE 及 GSDMD-eNT 的蛋白表达水平几乎检测不到,而 AP 模型组表达水平明显升高,巨噬细胞向 M1 表型极化,并发生焦亡。HBP 抑制剂肝素可以减轻 AP 小鼠的胰腺损伤[胰腺组织病理学损伤评分(分): 4.00 ± 0.63 比 8.00 ± 0.63 , $P < 0.05$],降低炎症因子 IL-1 β (ng/g: 0.490 ± 0.035 比 0.995 ± 0.010 , $P < 0.05$)和细胞焦亡标志物 GSDMD-eNT 的蛋白表达水平(灰度值: 0.970 ± 0.020 比 2.060 ± 0.030 , $P < 0.05$),ELANE 抑制剂能降低 HBP 诱导的细胞焦亡标志物 GSDMD-eNT 蛋白表达水平(灰度值: 0.490 ± 0.030 比 0.970 ± 0.020 , $P < 0.05$),减轻焦亡对胰腺组织的损伤作用[胰腺组织病理学损伤评分(分): 3.83 ± 0.75 比 8.00 ± 0.63 , $P < 0.05$]。此外,在 ELANE 或 caspase-1 基因缺失的 AP 模型中,胰腺组织焦亡水平和损伤评分均显著降低[GSDMD-eNT 蛋白表达(灰度值): 0.524 ± 0.096 、 2.150 ± 0.129 比 2.108 ± 0.068 , 胰腺组织病理学损伤评分(分): 3.63 ± 0.75 、 3.33 ± 0.52 比 8.00 ± 0.63 , 均 $P < 0.05$];而即使在 caspase-1 缺失条件下过度表达 ELANE 仍可导致胰腺细胞焦亡增加并加重组织损伤[GSDMD-eNT 蛋白表达(灰度值): 0.500 ± 0.008 比 2.150 ± 0.129 , 胰腺组织病理学损伤评分(分): 7.33 ± 0.52 比 3.33 ± 0.52 , 均 $P < 0.05$]。**结论** HBP 通过 ELANE-GSDMD 途径介导胰腺 M1 巨噬细胞焦亡,加重 AP 早期胰腺损伤的发生发展,为 AP 的治疗提供了新的靶点。

【关键词】 急性胰腺炎; 肝素结合蛋白; 弹性蛋白酶; 焦亡相关蛋白 GSDMD; 细胞焦亡

基金项目: 江苏省盐城市重点研发计划项目(YCBK202211)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.06.011

Heparin binding protein exacerbates early pancreatic injury in acute pancreatitis by mediating pyroptosis via the neutrophil serine protease elastase-gasdermin D pathway

Wu Jing, Chen Jianjun, Li Yingbin, Yang Chongyu, Wu Xufeng, Zhou Liangliang

Department of Emergency Medicine, Critical Care Unit, Yancheng First People's Hospital, Yancheng 224000, Jiangsu, China

Corresponding author: Zhou Liangliang, Email: zholia@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism by which heparin binding protein (HBP) mediates M1 macrophage pyroptosis via the neutrophil serine protease elastase (ELANE)-Gasdermin D (GSDMD) pathway in early pancreatic injury of acute pancreatitis (AP). **Methods** A total of 108 healthy male wild-type C57BL/6 mice, along with conditional gene knockout mice (-/-ELANE, -/-caspase-1) were selected. They were divided into groups using a random number table method: normal control group, AP model group, heparin group, ELANE inhibitor group, ELANE overexpression group, ELANE gene knockout group, caspase-1 gene knockout group, and caspase-1 gene knockout with ELANE overexpression group, with 6 mice per group. AP was induced by retrograde injection of 0.5 mL of 5% bile acid; the normal control group received retrograde injection of equal amount of normal saline. In the heparin group, heparin (100 U/kg) was injected via the tail vein immediately after model establishment. In the ELANE inhibitor group, the ELANE inhibitor MK0339 (10 mg/kg) was administered intraperitoneally 30 minutes before modeling. In the ELANE

overexpression group, an ELANE lentiviral vector was injected via the tail vein 30 minutes before modeling. Mice were sacrificed 48 hours after modeling, and pancreatic tissues were collected for histopathological observation under light microscopy and pancreatic injury scoring. Western blotting and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to detect the expression levels of relevant proteins and mRNA expression in pancreatic tissue, in order to investigate the effects of HBP on macrophage polarization and pyroptosis. **Results** In the AP model group, pancreatic HBP expression and histopathological injury scores increased over time, peaking at 48 hours, and then began to decrease; at 72 hours and 96 hours after modeling they were still significantly higher than at 6 hours (gray values: 5.017 ± 0.147 , 2.750 ± 0.351 vs. 1.055 ± 0.145 , both $P < 0.05$). In the normal control group, HBP, ELANE and GSDMD-eNT were almost undetectable in the pancreas, whereas the AP model group showed significantly elevated levels, with macrophages polarizing to the M1 phenotype and undergoing pyroptosis. The HBP inhibitor heparin alleviated pancreatic injury (pancreatic tissue injury score: 4.00 ± 0.63 vs. 8.00 ± 0.63 , $P < 0.05$), reduced inflammatory cytokine IL-1 β (ng/g: 0.490 ± 0.035 vs. 0.995 ± 0.010 , $P < 0.05$) and the pyroptosis marker GSDMD-eNT in AP mice levels (gray value: 0.970 ± 0.020 vs. 2.060 ± 0.030 , $P < 0.05$), the ELANE inhibitor suppressed HBP-induced macrophage pyroptosis reducing GSDMD-eNT (gray values: 0.490 ± 0.030 vs. 0.970 ± 0.020 , $P < 0.05$) and attenuated pyroptosis-mediated pancreatic damage (pancreatic tissue injury score: 3.83 ± 0.75 vs. 8.00 ± 0.63 , $P < 0.05$). Furthermore, in AP models lacking ELANE or caspase-1, pancreatic pyroptosis and tissue injury score were significantly reduced [protein expression of GSDMD-eNT (gray value): 0.524 ± 0.096 , 2.150 ± 0.129 vs. 2.108 ± 0.068 , pancreatic tissue injury score: 3.63 ± 0.75 , 3.33 ± 0.52 vs. 8.00 ± 0.63 , all $P < 0.05$]. Even under caspase-1 knockout conditions, ELANE overexpression led to enhanced pyroptosis and aggravated pancreatic injury [protein expression of GSDMD-eNT (gray values): 0.500 ± 0.008 vs. 2.150 ± 0.129 ; pancreatic tissue injury score: 7.33 ± 0.52 vs. 3.33 ± 0.52 , both $P < 0.05$]. **Conclusion** HBP exacerbates early pancreatic injury in AP by mediating M1 macrophage pyroptosis through the ELANE-GSDMD pathway, providing a potential new therapeutic target for AP.

【Key words】 Acute pancreatitis; Heparin binding protein; Elastase; Gasdermin D; Pyroptosis

Fund program: Key Research and Development Program of Yancheng City, Jiangsu Province (YCBK202211)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.06.011

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 是一种常见的消化系统疾病,其发病率和病死率均较高,但其发病机制目前尚未明确,阐明急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 的发病机制具有重要的临床意义。现有研究表明, SAP 的病理生理过程复杂,涉及胰腺腺泡细胞损伤、炎症反应、组织水肿、坏死等^[1-2]。尽管近年来 AP 的诊断和治疗取得了显著进展,但 SAP 的治疗仍面临挑战^[3]。其中中性粒细胞释放的肝素结合蛋白 (heparin binding protein, HBP) 可能是加重胰腺炎胰腺损伤的重要因子,肝素是 HBP 的天然拮抗剂,本课题组前期的研究结果表明, HBP 参与了 AP 早期胰腺组织的损伤^[4]。炎症反应是 SAP 发生发展的重要环节,中性粒细胞/巨噬细胞等先天性免疫细胞在 SAP 的发病过程中发挥着重要作用^[5]。巨噬细胞可分化为 M1 和 M2 两种表型, M1 巨噬细胞参与炎症反应,而 M2 巨噬细胞参与组织修复^[6]。巨噬细胞焦亡是一种程序性的细胞死亡方式,在多种炎症性疾病中起重要作用^[7]。近年来,有研究表示,胰腺巨噬细胞可能存在一条不同于一般意义上需要天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (caspase-1) 的焦亡通路,该通路依赖中性粒细胞丝氨酸蛋白酶弹性蛋白酶 (neutrophil serine protease elastase, ELANE) 对焦亡相关蛋白 Gasdermin D (GSDMD) 进行剪切,产生 GSDMD 蛋白

的 N 端片段 (GSDMD N-terminal fragment, GSDMD-eNT) 介导巨噬细胞穿孔,从而发生细胞焦亡^[8]。HBP 是一种中性粒细胞来源的丝氨酸蛋白酶,在多种炎症性疾病中发挥重要作用^[4,9]。有研究表明, HBP 可促进巨噬细胞向 M1 表型极化,并诱导细胞焦亡^[10],这可能是 HBP 加重 AP 早期胰腺损伤的重要机制。本研究旨在探讨 HBP 通过 ELANE-GSDMD 途径介导 M1 巨噬细胞焦亡在 AP 早期胰腺损伤中的作用机制,从而为 AP 的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: 一抗 HBP (1 : 1 000)、GSDMD (1 : 1 000)、GSDMD-eNT (1 : 1 000)、ELANE (1 : 1 000)、caspase-1 (1 : 1 000)、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH 1 : 1 000) 购自吉凯基因公司;牛黄胆酸、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的兔抗鼠二抗、菁类染料化合物 CY3 标记的山羊抗兔荧光二抗均购自上海吉至生化科技有限公司;电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 曝光液购自江苏碧云天生物科技有限公司;荧光定量反转录-聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒、反转录试剂盒购自南京诺维赞生物科技有限公司;选择性 ELANE 抑制剂 MK0339 购自美国 Selleck 公司。

1.2 实验动物分组和处理:选择 108 只健康雄性野生型 BL/C57、条件性基因(-/-ELANE、-/-caspase-1) 敲除小鼠,按随机数字表法分为正常对照组、AP 模型组、肝素组、ELANE 抑制剂组、ELANE 过表达组、ELANE 基因敲除组、caspase-1 基因敲除组、caspase-1 基因敲除且过表达 ELANE 组,每组 6 只。肝素组于制模后立即尾静脉注射肝素 100 U/kg, ELANE 抑制剂组于制模前 30 min 腹腔注射 ELANE 抑制剂 MK0339 10 mg/kg, ELANE 过表达组于制模前 30 min 尾静脉注射 ELANE 慢病毒载体。

1.3 AP 小鼠模型的建立:将小鼠麻醉后,行逆行胆胰管穿刺,分别向胆胰管内注射 5% 胆酸 0.5 mL 制备 AP 小鼠模型;正常对照组给予等量生理盐水。

1.4 伦理学:本实验中动物处置方法遵循《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35893018)》提出的原则和要求,并通过盐城市第一人民医院伦理委员会批准(审批号: IACUA-D2103065)。

1.5 检测指标及方法:术后观察小鼠一般情况,并于制模后 48 h 处死小鼠,采集胰腺组织备用。

1.5.1 胰腺组织病理学观察:将胰腺组织在 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h,脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋后进行切片(片厚 4 μ m),行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光镜下观察胰腺组织病理学改变,并进行胰腺组织病理学损伤评分。

1.5.2 炎症因子含量测定:将胰腺组织置于预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)中冲洗后,吸干表面液体,称取胰腺组织约 50~100 mg,按组织质量: PBS 体积=1:9(kg/L)加入预冷的 PBS(可加入蛋白酶抑制剂)中制备 10% 的组织匀浆,4 $^{\circ}$ C 条件下充分匀浆后,离心 10 min,取上清液备用。采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定组织匀浆上清液 PBS 中的总蛋白含量,用于后续结果标准化。采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定胰腺组织匀浆上清液中 IL-1 β 、TNF- α 水平,操作严格按照试剂盒说明书进行加样、孵育、洗涤、显色与终止反应,在酶标仪 450 nm 处读取吸光度(absorbance, A)值,根据标准曲线计算样本含量,结果以浓度/总蛋白量表示。采用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒测定胰腺组织匀浆上清液中 LDH 活性,按说明书配制反应体系,于波长 450 nm 或 340 nm(依试剂盒而定)读取 A 值并计算 LDH 活性。

1.5.3 采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测胰腺组织中 HBP、ELANE、GSDMD、GSDMD-eNT 的蛋白表达水平:提取胰腺组织样本或巨噬细胞总蛋白,裂解后提取总蛋白并定量;取总蛋白样本,加入 5 \times 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min;进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h;再用含吐温 20 的 Tris 缓冲液(Tris buffered saline with Tween 20, TBST)冲洗后,加入 GAPDH、HBP 抗体(1:1 000)、ELANE 抗体(1:1 000)、GSDMD 多克隆抗体(1:1 000)、GSDMD-eNT 多克隆抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;次日加入兔抗鼠免疫球蛋白 G 二抗(1:5 000),室温孵育 1 h;TBST 冲洗,ECL 显色,用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参照 GAPDH 灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

1.5.4 采用 qRT-PCR 检测胰腺组织中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、CD86、CD163、精氨酸酶 1(arginase 1, Arg1) 的 mRNA 表达水平:提取胰腺组织样本或巨噬细胞总 RNA,反转录为 cDNA,进行 qRT-PCR。iNOS、CD86、Arg1 和 CD163 等引物序列由沃吉生物科技有限公司合成。以 GAPDH 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量分析 iNOS、CD86、Arg1、CD163 的 mRNA 表达水平。

1.6 统计学分析:应用 GraphPadPrism 9.0 统计软件分析数据。计量资料符合正态分布以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey-Kramer 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AP 模型各时间点小鼠胰腺组织 HBP 的蛋白表达水平和胰腺组织病理学损伤评分的动态变化比较(图 1;表 1):AP 模型组小鼠胰腺组织中 HBP 蛋白表达水平和组织病理学损伤评分均随制模后时间延长而逐渐升高,于制模后 48 h 达到高峰,此后开始下降。制模后 24 h 胰腺组织 HBP 蛋白表达和组织病理学损伤评分均明显升高,制模后 48 h 时达到峰值,且均明显高于制模后 6 h(均 $P<0.05$)。于制模后 72 h、96 h 均明显降低,但仍高于制模后 6 h 水平。提示 AP 早期胰腺组织 HBP 蛋白表达和组织

损伤在 48 h 左右最为严重,随后炎症损伤有所缓解。

2.2 HBP/ELANE 对 AP 小鼠胰腺损伤及巨噬细胞极化的影响(表 2~5;图 2~4):正常对照组胰腺组织中 HBP、ELANE 及 GSDMD-eNT 的蛋白表达水平几乎检测不到,而 AP 模型组胰腺组织中 HBP、ELANE 及 GSDMD-eNT 的蛋白表达和 IL-1 β 水平均明显升高,提示 AP 模型诱导胰腺巨噬细胞向 M1 极化并伴随炎症焦亡反应增强。与 AP 模型组比较,各干预组胰腺组织的炎症损伤及相关指标均发生明显变化:肝素组小鼠胰腺中 HBP 蛋白表达明显下降,胰腺组织病理学损伤程度明显减轻,其病理损伤评分明显降低,同时 IL-1 β 水平显著降低,细胞焦亡标志物 GSDMD-eNT 蛋白表达明显下降,iNOS mRNA 表达亦明显下调($P < 0.05$)。ELANE 抑制剂组胰腺组织的病理损伤评分也明显降低,炎症和焦亡指标显著改善,但 iNOS mRNA 表达水平无明显改变,GSDMD-eNT 蛋白表达明显降低,IL-1 β 水平同步下降(均 $P < 0.05$)。与 AP 模型组比较,ELANE 基因敲除组胰腺损伤明显缓解,组织病理学损伤评分明显降低,iNOS mRNA 表达水平明显升高,GSDMD-eNT 蛋白表达水平明显下降,IL-1 β 水平也明显降低(均 $P < 0.05$)。相反,ELANE 过表达

组胰腺组织学损伤较 AP 模型组更加严重:组织病理学观察可见腺泡结构破坏和炎症细胞浸润较 AP 模型组更加明显,其组织病理学损伤评分明显高于 AP 模型组;同时 M1 型巨噬细胞活化进一步增强,与肝素组比较,ELANE 过表达组 iNOS mRNA 表达显著升高,GSDMD-eNT 蛋白表达和 IL-1 β 水平均进一步升高(均 $P < 0.05$)。各干预组间 M2 型巨噬细胞标志物 Arg1 和 CD163 的 mRNA 表达水平差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),说明不同干预对 M2 型巨噬细胞比例影响较小。以上结果提示:HBP 促进 AP 胰腺炎症损伤主要与巨噬细胞向 M1 型表型过度极化和细胞焦亡反应增强有关,而对 M2 型巨噬细胞无明显影响。

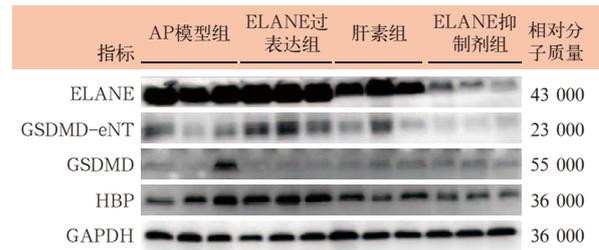
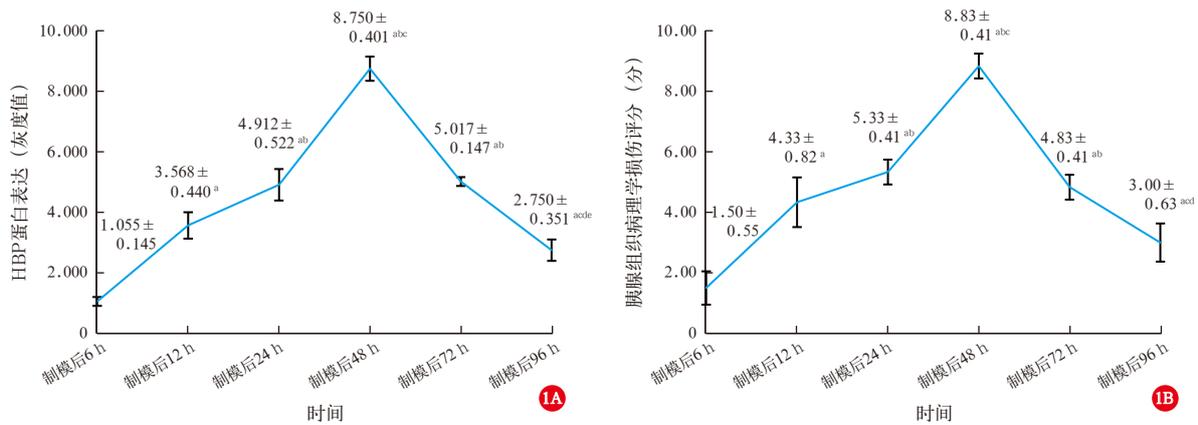


图 2 ELANE 过表达、肝素、ELANE 抑制剂对 AP 小鼠胰腺焦亡指标和 HBP 蛋白表达水平的影响



注:与制模后 6 h 比较,^a $P < 0.05$;与制模后 12 h 比较,^b $P < 0.05$;与制模后 24 h 比较,^c $P < 0.05$;与制模后 48 h 比较,^d $P < 0.05$;与制模 72 h 比较,^e $P < 0.05$

图 1 AP 模型小鼠 HBP 蛋白表达和胰腺组织病理学损伤评分的变化比较

表 1 各组 AP 小鼠胰腺 HBP、ELANE、GSDMD-eNT 的蛋白表达和 iNOS mRNA 表达及 IL-1 β 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	HBP 蛋白表达 (灰度值)	ELANE 蛋白表达 (灰度值)	GSDMD-eNT 蛋白表达 (灰度值)	iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	IL-1 β (ng/g)
AP 模型组	6	2.020 ± 0.050	2.020 ± 0.150	2.060 ± 0.030	1.000 ± 0.019	0.995 ± 0.010
肝素组	6	1.460 ± 0.050 ^a	1.010 ± 0.050 ^a	0.970 ± 0.020 ^a	0.590 ± 0.026 ^a	0.490 ± 0.035 ^a
ELANE 抑制剂组	6	1.530 ± 0.020 ^a	0.040 ± 0.020 ^{ab}	0.490 ± 0.030 ^{ab}	0.830 ± 0.010	0.390 ± 0.030 ^a
ELANE 过表达组	6	1.510 ± 0.030 ^a	3.270 ± 0.160 ^{abc}	2.830 ± 0.240 ^{bc}	0.830 ± 0.015	2.500 ± 0.170 ^{abc}

注:与 AP 模型组比较,^a $P < 0.05$;与肝素组比较,^b $P < 0.05$;与 ELANE 抑制剂组,^c $P < 0.05$

表 2 HBP 抑制、ELANE 基因敲除 / 过表达及 caspase-1 基因缺失对 AP 小鼠胰腺组织焦亡相关蛋白表达及病理学损伤评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	GSDMD 蛋白表达 (灰度值)	GSDMD-eNT 蛋白表达 (灰度值)	HBP 蛋白表达 (灰度值)	ELANE 蛋白表达 (灰度值)	胰腺组织病理学损伤评分 (分)
正常对照组	6	0.052 ± 0.057	0.025 ± 0.050	0.024 ± 0.051	0.035 ± 0.013	0.00 ± 0.00
AP 模型组	6	2.068 ± 0.070 ^a	2.108 ± 0.068 ^a	1.070 ± 0.082 ^a	2.010 ± 0.186 ^a	8.00 ± 0.63
肝素组	6	1.010 ± 0.115 ^{ab}	0.620 ± 0.082 ^{ab}	0.110 ± 0.082 ^b	0.445 ± 0.066 ^b	4.00 ± 0.63 ^a
ELANE 过表达组	6	1.250 ± 0.129 ^{ab}	1.325 ± 0.05 ^{abc}	0.950 ± 0.058 ^{ac}	3.025 ± 0.171 ^{abc}	8.83 ± 0.75 ^{ab}
ELANE 基因敲除组	6	1.985 ± 0.013 ^{acd}	0.524 ± 0.096 ^{abd}	1.010 ± 0.002 ^{ac}	0.020 ± 0.040 ^{bcd}	3.63 ± 0.75 ^{abc}
ELANE 抑制剂组	6	2.500 ± 0.082 ^{acd}	0.300 ± 0.082 ^{bd}	1.000 ± 0.003 ^{ac}	1.858 ± 0.09 ^{acd}	3.83 ± 0.75 ^{ace}
caspase-1 基因敲除且 ELANE 过表达组	6	2.000 ± 0.013 ^{acd}	0.500 ± 0.008 ^{abd}	1.033 ± 0.019 ^{ac}	3.530 ± 0.595 ^{abcef}	7.33 ± 0.52 ^{ace}
caspase-1 基因敲除组	6	1.803 ± 0.188 ^{acd}	2.150 ± 0.129 ^{acdefg}	1.385 ± 0.557 ^{ac}	2.115 ± 0.083 ^{aceg}	3.33 ± 0.52 ^{abdfg}

注：与正常对照组比较，^a*P*<0.05；与 AP 模型组比较，^b*P*<0.05；与肝素组比较，^c*P*<0.05；与 ELANE 过表达组比较，^d*P*<0.05；与 ELANE 基因敲除组比较，^e*P*<0.05；与 ELANE 抑制剂组比较，^f*P*<0.05；与 caspase-1 基因敲除且 ELANE 过表达组比较，^g*P*<0.05

表 3 肝素、ELANE 过表达和 ELANE 基因敲除对 AP 小鼠胰腺生物标志物的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	IL-1 β (ng/g)	LDH (U/mg)	TNF- α (ng/g)
AP 模型组	6	0.995 ± 0.008	0.995 ± 0.023	0.997 ± 0.008
肝素组	6	0.490 ± 0.035 ^a	0.420 ± 0.028 ^a	0.810 ± 0.020
ELANE 过表达组	6	2.540 ± 0.170 ^{ab}	1.930 ± 0.043 ^{ab}	1.620 ± 0.036 ^{ab}
ELANE 基因敲除组	6	0.390 ± 0.031 ^{abc}	0.310 ± 0.056 ^{abc}	0.590 ± 0.030 ^c

注：与 AP 模型组比较，^a*P*<0.05；与肝素组比较，^b*P*<0.05；与 ELANE 过表达组比较，^c*P*<0.05

表 4 各组 iNOS mRNA、Arg1 mRNA、CD163 mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	iNOS mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Arg1 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	CD163 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
AP 模型组	6	1.000 ± 0.019	0.198 ± 0.026	0.197 ± 0.010
肝素组	6	0.590 ± 0.026 ^a	0.167 ± 0.012	0.150 ± 0.004
ELANE 过表达组	6	0.830 ± 0.015 ^b	0.160 ± 0.008	0.130 ± 0.005
ELANE 基因敲除组	6	0.850 ± 0.016 ^b	0.150 ± 0.004	0.100 ± 0.005

注：与 AP 模型组比较，^a*P*<0.05；与肝素组比较，^b*P*<0.05；与 ELANE 过表达组比较，^c*P*<0.05

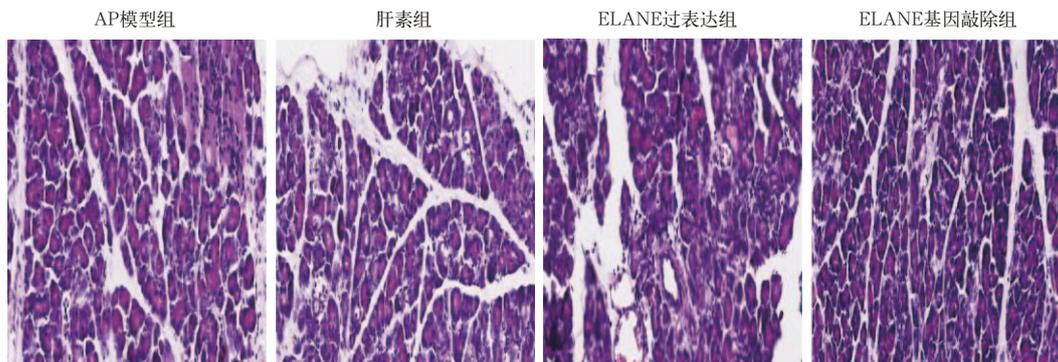


图 3 光镜下观察各组小鼠胰腺组织的病理学损伤情况 HE 染色 中倍放大

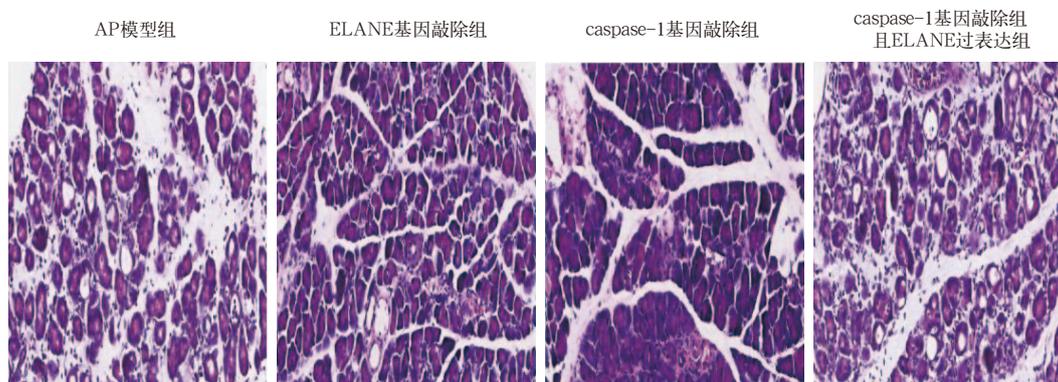


图 4 光镜下观察 ELANE、caspase-1 基因敲除 / 过表达对 AP 小鼠胰腺组织病理学改变的影响 HE 染色 中倍放大

表 5 ELANE、caspase-1 基因敲除 / 过表达对 AP 小鼠胰腺组织中炎症介质水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	IL-1 β (ng/g)	LDH (U/mg)	TNF- α (ng/g)
AP 模型组	6	0.995 \pm 0.010	0.995 \pm 0.023	0.996 \pm 0.010
ELANE 基因敲除组	6	0.490 \pm 0.035 ^a	0.420 \pm 0.028 ^a	0.810 \pm 0.030
caspase-1 基因敲除且 ELANE 过表达组	6	2.540 \pm 0.110 ^{ab}	1.930 \pm 0.040 ^{ab}	1.620 \pm 0.036 ^{ab}
caspase-1 基因敲除组	6	0.390 \pm 0.031 ^{abc}	0.310 \pm 0.060 ^{abc}	0.590 \pm 0.030 ^{abc}

注:与 AP 模型组比较,^a $P < 0.05$;与 ELANE 基因敲除组比较,^b $P < 0.05$;与 caspase-1 基因敲除且 ELANE 过表达组比较,^c $P < 0.05$

2.3 HBP 抑制剂和 ELANE 基因过表达 / 敲除对 AP 小鼠胰腺组织病理学损伤的影响 (图 3 ~ 4; 表 2): 光镜下观察显示:体内阻断 HBP 或调控 ELANE 表达可明显影响 AP 小鼠的胰腺组织病理学损伤程度。与 AP 模型组比较,肝素组小鼠胰腺腺泡结构破坏明显减轻、炎症细胞浸润减少,组织学损伤评分明显降低 ($P < 0.05$), ELANE 基因敲除组胰腺组织结构较 AP 模型组更加完整,出血及坏死灶明显减少,胰腺组织病理损伤评分进一步降低 ($P < 0.05$)。相反,ELANE 过表达组小鼠胰腺组织损伤较 AP 模型组更加严重,表现为腺泡结构破坏和坏死灶增多,炎症浸润加重,其组织病理学损伤评分明显高于 AP 模型组 ($P < 0.05$)。上述结果说明:阻断 HBP 或缺失 ELANE 均可减轻 AP 早期胰腺组织的损伤,而 ELANE 过度表达则会加重组织学损伤。

2.4 AP 小鼠胰腺组织细胞焦亡依赖 ELANE 通路 (表 2, 表 5; 图 5): 为进一步明确 AP 胰腺组织中巨噬细胞焦亡是否通过 ELANE 介导的非经典途径发生,本研究采用基因敲除和过表达策略对焦亡通路进行了验证。结果表明,无论应用 ELANE 抑制剂,还是构建 ELANE 基因敲除或 caspase-1 基因敲除的 AP 模型,小鼠的胰腺组织损伤均有不同

程度减轻。与 AP 模型组比较,ELANE 基因敲除组、ELANE 抑制剂组和 caspase-1 基因敲除组小鼠胰腺组织病理学损伤评分均明显降低 (均 $P < 0.05$)。然而,在 caspase-1 基因敲除且 ELANE 过表达组胰腺组织病理学损伤又明显加重,其损伤评分明显高于单纯 caspase-1 敲除组 ($P < 0.05$)。进一步的 Western blotting 结果显示:即使在 caspase-1 缺失的情况下,ELANE 过表达组小鼠胰腺组织中 GSDMD-eNT 蛋白水平仍保持显著升高状态,但明显低于 caspase-1 基因敲除组 ($P < 0.05$),提示有大量 GSDMD 被剪切激活。与此同时,单纯 ELANE 基因敲除组和 caspase-1 基因敲除组胰腺组织中炎症介质的含量明显降低,尤其是促炎细胞因子 IL-1 β 、LDH 及 TNF- α 水平均较 AP 模型组明显下降 (均 $P < 0.05$)。如 ELANE 基因敲除组胰腺组织中 IL-1 β 水平约相当于 AP 模型组的半值;caspase-1 基因敲除组 IL-1 β 进一步降低,ELANE 基因敲除组和 caspase-1 基因敲除组 LDH 和 TNF- α 水平均较 AP 模型组明显降低 (均 $P < 0.05$)。值得注意的是,即使在 caspase-1 基因缺失背景下过度表达 ELANE (caspase-1 基因敲除且 ELANE 过表达组),给予 HBP 抑制剂肝素后 (肝素组) AP 小鼠的胰腺组织病理学损伤仍明显减轻,与未使用肝素的 AP 模型组相比其损伤评分明显降低 ($P < 0.05$)。以上结果提示:在 AP 早期胰腺组织中,除经典的依赖 caspase-1 的炎性小体途径外,还存在一条依赖 ELANE 的非经典细胞焦亡途径;ELANE 可在无需 caspase-1 参与的情况下剪切并激活 GSDMD,诱导胰腺巨噬细胞发生焦亡反应。同时 HBP 在 ELANE 介导的焦亡过程中发挥了关键作用,即使在 ELANE 过度表达的情况下,肝素干预仍能显著减轻胰腺组织损伤,体现出肝素对 AP 胰腺的保护作用。

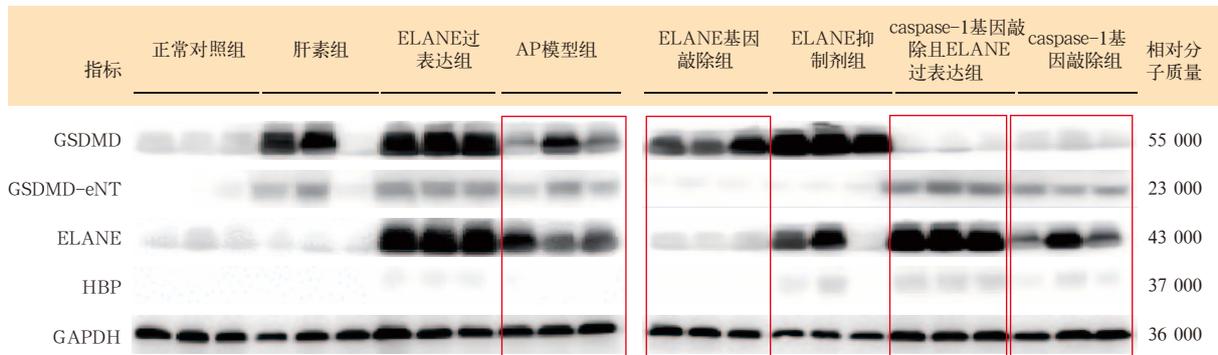


图 5 ELANE 和 caspase-1 基因对 AP 小鼠胰腺 GSDMD-eNT 表达的影响

3 讨论

本研究揭示了 AP 小鼠模型中独立于经典 caspase-1 途径的 ELANE-GSDMD 途径介导胰腺细胞焦亡,参与 AP 早期胰腺损伤的发生发展,为认识 AP 的发病机制提供了新的视角,也为 AP 的治疗提供了新的靶点。本研究结果表明,细胞焦亡在 AP 中发挥重要作用。

HBP 是一种中性粒细胞来源的丝氨酸蛋白酶,在多种炎症性疾病中发挥重要作用^[10]。本研究结果显示,AP 小鼠胰腺组织中 HBP 的表达水平升高,且 HBP 抑制剂肝素可明显减轻 AP 小鼠的胰腺损伤,降低炎症因子水平,并减少 M1 巨噬细胞的数量。本课题组前期的研究已经显示,HBP 可以促进炎症反应,加重 AP 的组织损伤^[4,11]。除了经典的细胞凋亡,焦亡等细胞死亡方式也深度参与了 AP 的组织损伤,ELANE-GSDMD 途径是一种不同于一般意义上需要 caspase 的焦亡通路^[12-14],该通路依赖 ELANE 对 GSDMD 进行剪切,产生穿孔蛋白 GSDMD-eNT 介导巨噬细胞穿孔,从而发生细胞焦亡。本研究结果显示,HBP 可与 ELANE 结合,并促进 GSDMD 的剪切,导致巨噬细胞焦亡。巨噬细胞焦亡是一种程序性细胞死亡方式,在多种炎症性疾病中发挥重要作用。本研究结果显示,AP 小鼠胰腺组织中巨噬细胞的焦亡增加,并且 ELANE 抑制剂和 ELANE 基因敲除(以及 caspase-1 基因敲除)可减轻 AP 小鼠的胰腺损伤,表明巨噬细胞焦亡可加重 AP 炎症反应和胰腺组织损伤。M1 巨噬细胞是参与 AP 早期炎症反应的主力,诱导组织细胞毒性过程,清除坏死细胞并促进炎症进展。本研究结果显示,AP 小鼠胰腺组织中 M1 巨噬细胞的数量升高,且 HBP 拮抗剂肝素可以减少 M1 巨噬细胞的数量和焦亡,减轻 AP 小鼠的胰腺损伤。表明 M1 巨噬细胞焦亡可能参与了 AP 早期胰腺损伤的发生发展。M2 巨噬细胞参与组织修复,促进炎症消退和组织再生。本研究结果显示,AP 小鼠胰腺组织中 M2 巨噬细胞标志物没有明显变化。这可能与本研究观察时间点有关,M2 巨噬细胞数量可能在 AP 后期才会升高。本研究结果表明,HBP 抑制剂和 ELANE 抑制剂均可减轻 AP 小鼠的胰腺损伤,这为 AP 的治疗提供了新的靶点。未来需要进一步研究肝素和 ELANE 抑制剂,如 MK0339 在 AP 治疗中的应用价值^[15],包括其安全性、有效性和作用机制。

本研究存在一些局限性。首先,本研究只观察

了 AP 早期(48 h)的变化,未来需要进一步研究 AP 后期(72 h 及以后)的变化。其次,本研究只使用了胆酸诱导的 AP 小鼠模型,未来需要进一步研究其他 AP 模型,如胰管结扎模型。最后,本研究只观察了 HBP 抑制剂和 ELANE 抑制剂的作用,未来需要进一步研究其他潜在的治疗靶点。综上所述,本研究揭示了 HBP 通过 ELANE-GSDMD 途径介导 AP 胰腺细胞焦亡,加重 AP 早期胰腺损伤的发生发展。HBP 抑制剂肝素、ELANE 敲除和 ELANE-GSDMD 途径抑制剂 MK0339 可以减轻 AP 小鼠的胰腺损伤,这为 AP 的治疗提供了新的靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Practice guidelines in acute pancreatitis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101 (10): 2379-2400. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2006.00856.x.
- [2] Pandolfi SJ, Saluja AK, Imrie CW, et al. Acute pancreatitis: bench to the bedside [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132 (3): 1127-1151. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.01.055.
- [3] Zerem E. Treatment of severe acute pancreatitis and its complications [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 (38): 13879-13892. DOI: 10.3748/wjg.v20.i38.13879.
- [4] Zhou LL, Chen JJ, Mu GH, et al. Heparin-binding protein (HBP) worsens the severity of pancreatic necrosis via up-regulated M1 macrophages activation in acute pancreatitis mouse models [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (2): 11978-11986. DOI: 10.1080/21655979.2021.2011018.
- [5] 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.
- [6] Kambara H, Liu F, Zhang XY, et al. Gasdermin D exerts anti-inflammatory effects by promoting neutrophil death [J]. *Cell Rep*, 2018, 22 (11): 2924-2936. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.067.
- [7] Sollberger G, Choidas A, Burn GL, et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps [J]. *Sci Immunol*, 2018, 3 (26): eaar6689. DOI: 10.1126/sciimmunol.aar6689.
- [8] Shi JJ, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, 526 (7575): 660-665. DOI: 10.1038/nature15514.
- [9] Nunes QM, Su DH, Brownridge PJ, et al. The heparin-binding proteome in normal pancreas and murine experimental acute pancreatitis [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (6): e0217633. DOI: 10.1371/journal.pone.0217633.
- [10] Fisher J, Linder A. Heparin-binding protein: a key player in the pathophysiology of organ dysfunction in sepsis [J]. *J Intern Med*, 2017, 281 (6): 562-574. DOI: 10.1111/joim.12604.
- [11] Nunes QM, Mournetas V, Lane B, et al. The heparin-binding protein interactome in pancreatic diseases [J]. *Pancreatol*, 2013, 13 (6): 598-604. DOI: 10.1016/j.pan.2013.08.004.
- [12] 张何为,傅强,巩传勇,等.清肺承气汤对重症胰腺炎所致 ARDS 患者肺的局部免疫干预作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2022, 29 (1): 49-52. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2022.01.011.
- [13] 李君秋,戴彦成,曹红燕,等.大承气汤能够通过调节肠道微生物群抑制轻症急性胰腺炎患者炎症反应并促进胃肠功能恢复 [J]. *中华危重病急救医学*, 2023, 35 (2): 170-176. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220921-00852.
- [14] Chen KW, Monteleone M, Boucher D, et al. Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps [J]. *Sci Immunol*, 2018, 3 (26): eaar6676. DOI: 10.1126/sciimmunol.aar6676.
- [15] Linder A, Arnold R, Boyd JH, et al. Heparin-binding protein measurement improves the prediction of severe infection with organ dysfunction in the emergency department [J]. *Crit Care Med*, 2015, 43 (11): 2378-2386. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001265.

(收稿日期: 2025-01-24)

(责任编辑: 邸美仙)