·胰腺疾病·

DOI：10.12449/JCH260220

线粒体钙单向转运体在急性胰腺炎小鼠模型胰腺导管上皮细胞骨架中的作用及其机制

陈峭峰[1,2,3]，傅庆子[4]，杨慧莹[5]，洪军波[1,2,3]，朱　亮[1,2,3]，杨真真[1,2,3]，唐国都[5]，张石玉[1,2,3]

1 南昌大学第一附属医院消化内科，南昌 330006
2 江西省消化疾病重点实验室，南昌 330006
3 江西省胃肠病学临床医学研究中心，南昌 330006
4 江西省妇幼保健院医学遗传中心，南昌 330006
5 广西医科大学第一附属医院消化内科，南宁 530000

通信作者：张石玉，ndyfy09676@ncu.edu.cn（ORCID：0000-0002-3596-7807）

摘要：目的　探讨线粒体钙单向转运体（MCU）调控铁死亡对雨蛙肽（CAE）诱导的急性胰腺炎（AP）小鼠模型胰腺导管上皮细胞骨架的影响，了解MCU在AP发病过程中的作用，进而为临床治疗提供理论基础。**方法**　动物实验：将4周龄野生型雄性C57BL6/J小鼠随机分为对照组和AP组，每组6只。AP组通过腹腔注射CAE构建AP模型，对照组腹腔注射等量的生理盐水。造模24 h后收集小鼠血清和胰腺组织。通过HE染色观察胰腺组织病理变化。蛋白免疫印迹法检测MCU、谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4）和长链脂酰辅酶A合成酶4（ASCL4）的表达水平。使用试剂盒检测小鼠血清淀粉酶水平。细胞实验：人胰腺导管上皮细胞系HPDE6-C7与CAE共培养24 h建立体外AP模型，分为对照组、CAE组、RR（MCU活性抑制剂）组、CAE+RR组、Fer-1（铁死亡抑制剂）组、CAE+Fer-1组、Erastin（铁死亡诱导剂）组、CAE+Erastin组。CCK-8检测不同干预剂对细胞活力的影响。蛋白免疫印迹法检测MCU、GPX4和ASCL4的表达水平。免疫荧光检测活性氧（ROS）、微丝细胞骨架和单层细胞通透性。试剂盒检测丙二醛（MDA）、谷胱甘肽（GSH）、Fe^{2+}和总铁浓度。计量资料多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-*t*检验。**结果**　动物实验：与对照组相比，AP组小鼠胰腺组织学病理评分和淀粉酶水平均显著升高，MCU和ASCL4表达显著升高、GPX4表达显著下降（*P*值均<0.05）。细胞实验：与对照组相比，CAE组MCU和ASCL4表达升高、GPX4表达下降，Fe^{2+}和总铁浓度、MDA浓度、ROS绿色荧光强度、单层细胞通透性均显著升高，GSH浓度下降（*P*值均<0.05），并出现细胞微丝骨架破坏。与CAE组相比，CAE+RR组GPX4表达升高、ASCL4表达下降，Fe^{2+}和总铁浓度、MDA浓度、ROS绿色荧光强度、单层细胞通透性均显著性下降，GSH浓度上升（*P*值均<0.05），细胞微丝骨架破坏程度减轻。与CAE组相比，CAE+Fer-1组Fe^{2+}和总铁浓度、MDA浓度、ROS绿色荧光强度、单层细胞通透性均显著下降，GSH浓度显著上升（*P*值均<0.05），细胞微丝骨架破坏程度减轻。与CAE组相比，CAE+Erastin组Fe^{2+}和总铁浓度、MDA浓度、ROS绿色荧光强度、单层细胞通透性均显著升高，GSH浓度显著下降（*P*值均<0.05），细胞微丝骨架破坏程度减轻。**结论**　在AP发病时，MCU介导氧化应激引发铁死亡导致胰腺导管上皮细胞屏障破坏，可能是AP的发病机制之一。

关键词：胰腺炎；细胞骨架；模型，动物

基金项目：国家自然科学基金（82460134，81970558）；江西省自然科学基金（20232BAB206021）

Role and mechanism of mitochondrial calcium uniporter in the cytoskeleton of pancreatic ductal epithelial cells in a mouse model of acute pancreatitis

CHEN Qiaofeng[1,2,3]，*FU Qingzi*[4]，*YANG Huiying*[5]，*HONG Junbo*[1,2,3]，*ZHU Liang*[1,2,3]，*YANG Zhenzhen*[1,2,3]，*TANG Guodu*[5]，*ZHANG Shiyu*[1,2,3]

1. Department of Gastroenterology，The First Affiliated Hospital of Nanchang University，Nanchang 330006，China；2. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Digestive Diseases，Nanchang 330006，China；3. Jiangxi Clinical Research Center for

Gastroenterology, *Nanchang 330006*, *China*; *4. Department of Medical Genetics*, *Jiangxi Maternal and Child Health Hospital*, *Nanchang 330006*, *China*; *5. Department of Gastroenterology*, *The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University*, *Nanning 530000*, *China*

Corresponding author: *ZHANG Shiyu*, *ndyfy09676@ncu.edu.cn* (*ORCID*: *0000-0002-3596-7807*)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of mitochondrial calcium uniporter (MCU) on the cytoskeleton of pancreatic ductal epithelial cells in a mouse model of acute pancreatitis (AP) induced by caerulein (CAE), to analyze the role of MCU in the development of AP, and to provide a theoretical basis for clinical treatment. **Methods** In the *in vivo* experiment, wild-type male C57BL6/J mice, aged 4 weeks, were randomly divided into control group and AP group, with 6 mice in each group. The mice in the AP group were given intraperitoneal injection of CAE to establish a model of AP, and those in the control group were given intraperitoneal injection of an equal volume of normal saline. Serum and pancreatic tissue samples were collected after 24 hours of modeling. HE staining was used to observe pancreatic histopathological changes; Western Blot was used to measure the expression levels of MCU, glutathione peroxidase 4 (GPX4), and acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ASCL4); kits were used to measure the serum level of amylase. In the *in vitro* experiment, the human pancreatic ductal epithelial cell line HPDE6-C7 was co-cultured with CAE for 24 hours to establish an *in vitro* AP model, and the cells were divided into control group, CAE group, RR (an MCU activity inhibitor) group, CAE+RR group, Fer-1 (an ferroptosis inhibitor) group, CAE+Fer-1 group, Erastin (an ferroptosis inducer) group, and CAE+Erastin group. CCK-8 assay was used to observe the influence of different agents on cell viability; Western Blot was used to measure the expression levels of MCU, GPX4, and ASCL4; immunofluorescence assay was used to measure reactive oxygen species (ROS), actin cytoskeleton, and monolayer permeability; kits were used to measure the concentrations of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), Fe^{2+}, and total iron. A one-way analysis of variance was used for comparison of continuous data between multiple groups, and the least significant difference *t*-test was used for comparison between two groups. **Results** In the *in vivo* experiment, compared with the control group, the AP group had significant increases in pancreatic histopathological score, the serum level of amylase, and the expression levels of MCU and ASCL4, as well as a significant reduction in the expression of GPX4 (all $P<0.05$). In the *in vitro* experiment, compared with the control group, the CAE group had significant increases in the expression levels of MCU and ASCL4, a significant reduction in the expression of GPX4, and significant increases in the concentrations of Fe^{2+}, total iron, and MDA, the green fluorescence intensity of ROS, and monolayer permeability, as well as a significant reduction in the concentration of GSH (all $P<0.05$), with the presence of actin cytoskeleton disruption. Compared with the CAE group, the CAE+RR group had a significant increase in the expression level of GPX4, a significant reduction in the expression level of ASCL4, and significant reductions in the concentrations of Fe^{2+}, total iron, and MDA, the green fluorescence intensity of ROS, and monolayer permeability and a significant increase in the concentration of GSH (all $P<0.05$), with alleviation of actin cytoskeleton disruption. Compared with the CAE group, the CAE+Fer-1 group had significant reductions in the concentrations of Fe^{2+}, total iron, and MDA, the green fluorescence intensity of ROS, and monolayer permeability and a significant increase in the concentration of GSH (all $P<0.05$), with alleviation of actin cytoskeleton disruption. Compared with the CAE group, the CAE+Erastin group had significant increases in the concentrations of Fe^{2+}, total iron, and MDA, the green fluorescence intensity of ROS, and monolayer permeability and a significant reduction in the concentration of GSH (all $P<0.05$), with aggravation of actin cytoskeleton disruption. **Conclusion** During the onset of AP, MCU mediates oxidative stress-induced ferroptosis and leads to the disruption of the pancreatic ductal epithelial barrier, which may be one of the possible pathogeneses of AP.

Key words: Pancreatitis; Cytoskeleton; Models, Animal

Research funding: National Natural Science Foundation of China (82460134, 81970558); Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20232BAB206021)

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是胃肠病学中常见的急症之一[1],全球发病率为每年每10万人30~40例[2]。其中,约20%的AP患者发展为中度AP或重症AP,其病死率为20%~40%[3-4]。研究表明,Ca^{2+}的动力

学紊乱和AP的发病密切相关[5-6]。线粒体钙单向转运体(mitochondrial calcium uniporter, MCU)是介导线粒体Ca^{2+}摄取的关键蛋白,在细胞有氧代谢中发挥重要作用[7]。MCU过表达引起的线粒体钙离子蓄积会损害线粒体功能,促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成[8]。在AP大鼠模型中,抗氧化剂可显著逆转AP的炎症反应[9]。然而,MCU在AP胰腺导管上皮细胞骨架中的作用尚未见报道。

胰腺导管黏膜屏障对保护胰腺实质免受胆汁和胰蛋白酶等物质影响具有重要作用[10]。铁死亡是一种依赖Fe^{2+}的磷脂过氧化作用驱动的细胞死亡模式[11],其形态学特征主要包括线粒体皱缩、线粒体膜致密和线粒体嵴减少[12];而在生物化学和遗传学水平上则表现为谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)的表达下调,前列腺素内过氧化物合酶2[13]、长链脂酰辅酶A合成酶4(acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)[14-16]、铁蛋白轻链和铁蛋白重链[17]的表达上调。相关研究结果表明,铁死亡可促进AP的发病[18-19],抑制铁死亡可以减轻AP引起的肺损伤[19]、肾损伤[20]和肠道屏障损伤[21]。但目前尚未有相关研究报道铁死亡在胰腺导管黏膜屏障中的作用。因此,本研究拟通过体内和体外AP模型,系统探讨MCU对氧化应激、铁死亡和胰腺导管上皮细胞骨架的影响。

1 材料和方法

1.1 *动物实验和细胞实验分组* 本研究所有实验均于2023年6月—2024年12月进行。(1)小鼠实验:将12只小鼠用随机数字表法随机分为对照组和AP组,每组6只。为诱导建立AP模型,以1 h间隔腹腔注射50 μg/kg的雨蛙肽(ceruletide, CAE),共7次。对照组小鼠腹腔注射等体积生理盐水。末次腹腔注射后24 h,从每只小鼠下腔静脉采集血液以测定淀粉酶和甘油三酯(triglyceride, TG)水平。取出胰腺组织用于HE染色、免疫组织化学和Western Blot分析。(2)细胞实验:将HPDE6-C7人胰腺导管上皮细胞(上海劲丰生物科技有限公司,批号:GT1730C)使用CAE(100 nmol/L, Amquar,批号:EYS113,美国)、TG(2.5 mmol/L,北京索莱宝科技有限公司,批号:T9420)、钌红(ruthenium red, RR)(10 mmol/L, Amquar,批号:EI2414,美国)和3-(1H-1,2,3-三唑-4-基)吡啶(0.25 μmol/L, Amquar,批号:EI2418,美国)处理24 h,分为8组:对照组、CAE组、RR(MCU活性抑制剂)组、CAE+RR组、Fer-1(铁死亡抑制剂)组、CAE+Fer-1组、Erastin(铁死亡诱导剂)组和CAE+Erastin组。细胞计数试剂盒-8(cell countingkit-8, CCK-8)检测不同干预剂对细胞活力的影响;Western Blot法检测MCU、GPX4和ASCL4的表达水平;免疫荧光检测ROS、微丝细胞骨架和单层细胞通透性;试剂盒检测丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、Fe^{2+}和总铁浓度。

1.2 *实验动物* 实验选用4周龄野生型雄性C57BL6/J小鼠,购自长沙天勤生物技术有限公司。实验动物生产许可证编号为:SCXK(湘)2022-0011,实验动物使用许可证编号为:SYXK(赣)2021-0004。所有小鼠饲养于22~24 ℃的特定无病原体环境中,自由获取食物和水,使用普通饲料(批号:11001,北京博爱港生物技术有限公司,中国)持续喂养4周。

1.3 *细胞培养* HPDE6-C7人胰腺导管上皮细胞系购自广州杰尼奥生物科技有限公司。细胞在无菌环境中于37 ℃和5% CO_2条件下使用完全培养基进行培养。将细胞以1×10^3/mL的密度接种于直径60 mm的无菌培养皿(批号:430166,康宁公司,美国)中,当细胞融合度达到70%时,使用不同浓度的干预剂处理不同组别的细胞24 h。

1.4 *淀粉酶和TG检测* 所有操作步骤均严格按照TG检测试剂盒(批号:c061-a,长春汇力生物技术有限公司)和淀粉酶检测试剂盒(批号:C033,长春汇力生物技术有限公司)的说明书进行。

1.5 *HE染色* 胰腺组织浸入4%多聚甲醛溶液中固定12 h,石蜡包埋并切成薄片。每张切片随机选取3个视野计算胰腺组织病理学评分。胰腺组织病理学评分按照Van Laethem等[22]研究中描述的标准进行。

1.6 *蛋白提取* 移除培养基后,用RIPA裂解液(批号:P0013K,上海碧云天生物技术有限公司)裂解细胞后,于4 ℃、12 000 r/min离心(离心半径9.8 cm)15 min。收集200 μL上清液,加入50 μL蛋白上样缓冲液(批号:P1015,北京索莱宝科技有限公司)并混匀。混合物在100 ℃条件下加热10 min使蛋白变性。所得总蛋白储存于-20 ℃冰箱备用。

1.7 *Western Blot分析* 蛋白质经SDS-PAGE分离后,转印至0.22 μm PVDF膜上。膜在26 ℃条件下用5%脱脂奶粉溶液封闭45 min。使用TBST溶液洗涤3次后,将膜与一抗(批号:D2Z3B,CST,英国,1∶1 000)于4 ℃孵育12 h。再次用TBST溶液洗涤后,将膜与二抗(批号:5151P,CST,英国,1∶10 000)于26 ℃避光孵育1 h。使用Li-COR Odyssey双色红外荧光成像系统检测荧光信号。

1.8 细胞毒性试验 CCK-8购自上海碧云天生物技术有限公司（批号：C0038）。所有操作按照试剂盒说明书执行，最后在450 nm波长处测量吸光度值。

1.9 ROS检测 细胞经PBS溶液洗涤3次后，向培养皿中加入2 mL含有10 μmol/L DCFH-DA（批号：S0033S，上海碧云天生物技术有限公司）的无血清培养基。在37 ℃细胞培养箱中避光孵育20 min，并用无血清细胞培养基洗涤3次。对荧光显微镜（批号：CKX41，奥林巴斯株式会社，日本）下捕获的绿色荧光图像通过ImageJ软件进行分析。同样，随机选取3个区域计算平均荧光强度用于后续统计分析。

1.10 MDA检测 收集6孔板中的细胞，加入RIPA裂解缓冲液裂解30 min，离心后收集上清液用于后续分析。MDA检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司（批号：S0131S）。根据制造商说明书配制MDA检测工作液和MDA标准品，随后根据说明书分别加入检测工作液、煮沸、冷却及离心（1 000 r/min，离心半径9.8 cm，26 ℃，10 min）后，收集200 μL上清液加入96孔板中。随后使用酶标仪在532 nm波长处测量吸光度值。MDA浓度根据标准曲线计算。

BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司（批号：P0010）。根据制造商说明书操作。最后使用酶标仪在562 nm波长处测量吸光度值。各组的蛋白浓度根据标准曲线计算。每毫克蛋白质的MDA量通过将MDA浓度除以相应的总蛋白浓度计算得出。

1.11 GSH检测 收集HPDE6-C7细胞，使用PBS溶液洗涤3次后，将细胞重悬并通过超声破碎。破碎的细胞悬液以3 500 r/min（离心半径9.8 cm）离心10 min，然后取0.1 mL上清液用于后续分析。按照GSH和氧化型GSH测定试剂盒（批号：S0053，上海碧云天生物技术有限公司）的说明操作，最后使用酶标仪在405 nm波长处测量吸光度值。

1.12 免疫荧光微丝染色 HPDE6-C7细胞在无菌玻片上用37 ℃的PBS溶液洗涤2次后，加入4%多聚甲醛在26 ℃条件下固定10 min。细胞再次用PBS溶液洗涤2次，然后加入0.5% Triton X-100处理5 min。向玻片加入200 μL鬼笔环肽（200 nmol/L；批号：CA1610，北京索莱宝科技有限公司），于37 ℃避光孵育30 min。使用PBS溶液洗涤2次后，加入200 μL DAPI（100 nmol/L；批号：S2110，北京索莱宝科技有限公司）染色细胞核。最后于荧光显微镜（批号：CKX41，奥林巴斯株式会社，日本）下观察微丝的形态特征。

1.13 单层细胞通透性试验 将含有约100 000个细胞的100 μL完全培养基加入Transwell系统（批号：3413，康宁公司，美国）的顶室，向基底室加入600 μL完全培养基。在37 ℃培养箱中培养24 h后，不同组别分别使用相应的干预剂处理24 h。移除培养基并用PBS溶液洗涤细胞3次后，向顶室加入200 μL FITC-葡聚糖3 000（1 mg/mL，批号：46944，Sigma-Aldrich，美国），向基底室加入600 μL PBS溶液。细胞孵育2 h后，从基底室取出2 μL液体加入96孔板，通过酶标仪（激发/发射波长：490/520 nm）测量吸光度值。

1.14 统计学方法 采用GraphPad Prism 8软件进行数据统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

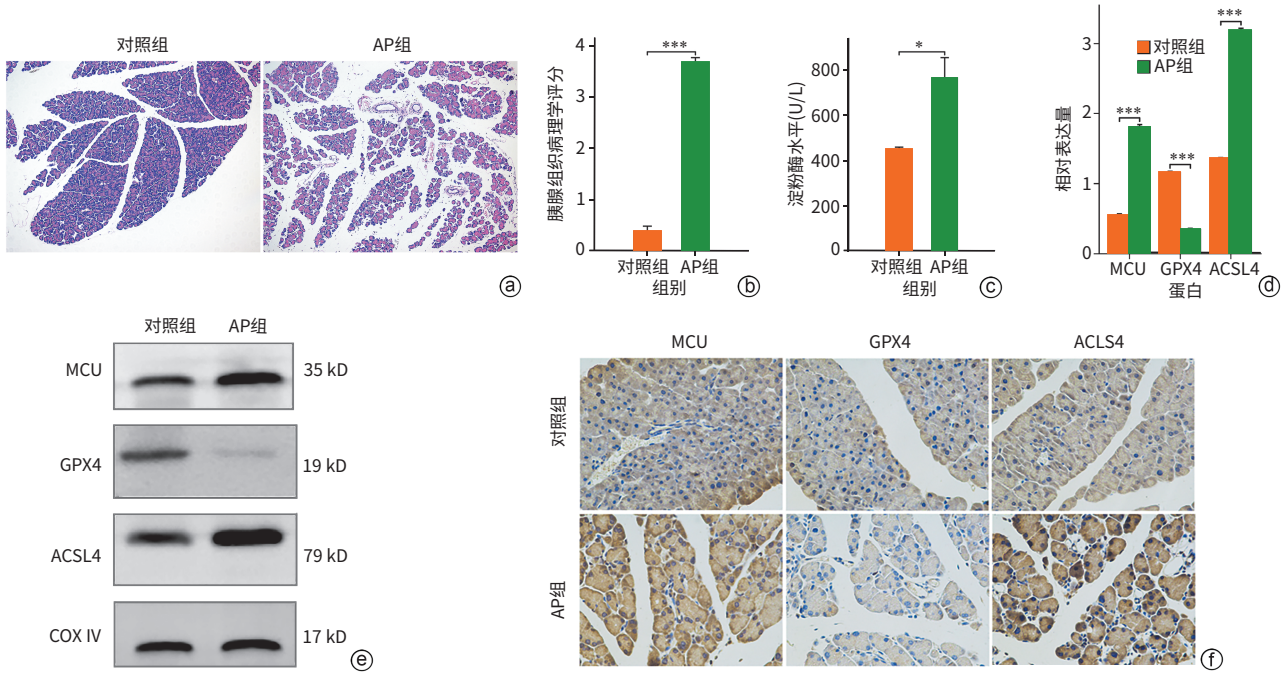
2.1 动物实验 HE染色结果显示，AP组小鼠胰腺组织出现明显水肿、中性粒细胞浸润和小叶间隙增宽（图1a）；小鼠胰腺组织病理学评分及淀粉酶水平较对照组显著性升高（P值均<0.05）（图1b、c），表明小鼠AP模型构建成功；Western Blot结果表明，AP组胰腺导管组织中MCU和ACSL4高表达（$P<0.001$），而GPX4表达下调（$P<0.001$）（图1d、e）；免疫组化结果显示，AP组胰腺组织中MCU和ACLL4高表达，而GPX4表达下调（图1f）。

2.2 细胞实验

2.2.1 不同浓度干预剂对细胞活力的影响 细胞活力检测结果显示，RR、Fer-1和Erastin浓度分别在10 μmol/L、10 μmol/L和1 μmol/L时能保持细胞活力在90%左右（图2）。

2.2.2 MCU、铁死亡特征性蛋白、Fe^{2+}浓度、氧化应激的变化及RR干预对上述指标的影响 与对照组相比，CAE组MCU和ACLS4的表达显著上调，GPX4表达显著下调；RR干预可显著逆转GPX4和ACSL4的变化趋势（P值均<0.05）（图3a、b）。与对照组相比，CAE组的细胞内Fe^{2+}浓度和细胞内总铁浓度均显著升高，RR的干预可以显著逆转细胞内Fe^{2+}浓度和总铁浓度的升高（P值均<0.05）（图3c）。与对照组相比，CAE组ROS绿色荧光强度显著增强，CAE组的MDA浓度显著增加，GSH浓度显著下降，RR的干预可以显著逆转上述变化（P值均<0.05）（图3d～g）。

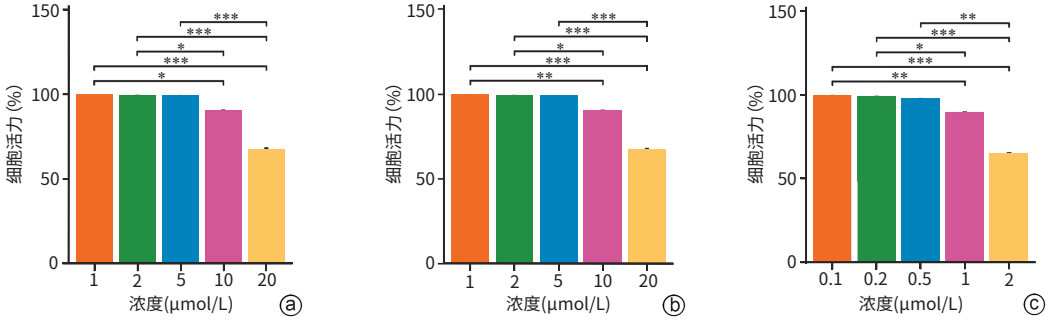
2.2.3 微丝细胞骨架、单层细胞通透性的变化以及RR干预对上述指标的影响 微丝细胞骨架观察显示，对



注：a，各组小鼠胰腺组织HE染色（×200）；b，各组小鼠胰腺组织病理学评分；c，各组小鼠血清淀粉酶水平；d，各组小鼠MCU、GPX4和ACSL4的Western Blot条带；e，各组MCU、GPX4和ACSL4较内参的相对表达量；f，各组小鼠胰腺组织MCU、GPX4和ACSL4的免疫组化染色（×400）。*P<0.05，***P<0.001。AP，急性胰腺炎；MCU，线粒体钙单向转运体；GPX4，谷胱甘肽过氧化物酶4；ACSL4，长链脂酰辅酶A合成酶4；COX Ⅳ，线粒体内参抗体。

图1　各组小鼠胰腺导管组织中MCU及铁死亡相关蛋白的变化

Figure 1　Changes in MCU and ferroptosis-related proteins in pancreatic ductal tissues of mice from each group



注：a，RR（线粒体钙单向转运体活性和抑制剂）；b，Fer-1c（铁死亡，抑制剂）；Erastin（铁死亡诱导剂）。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001。

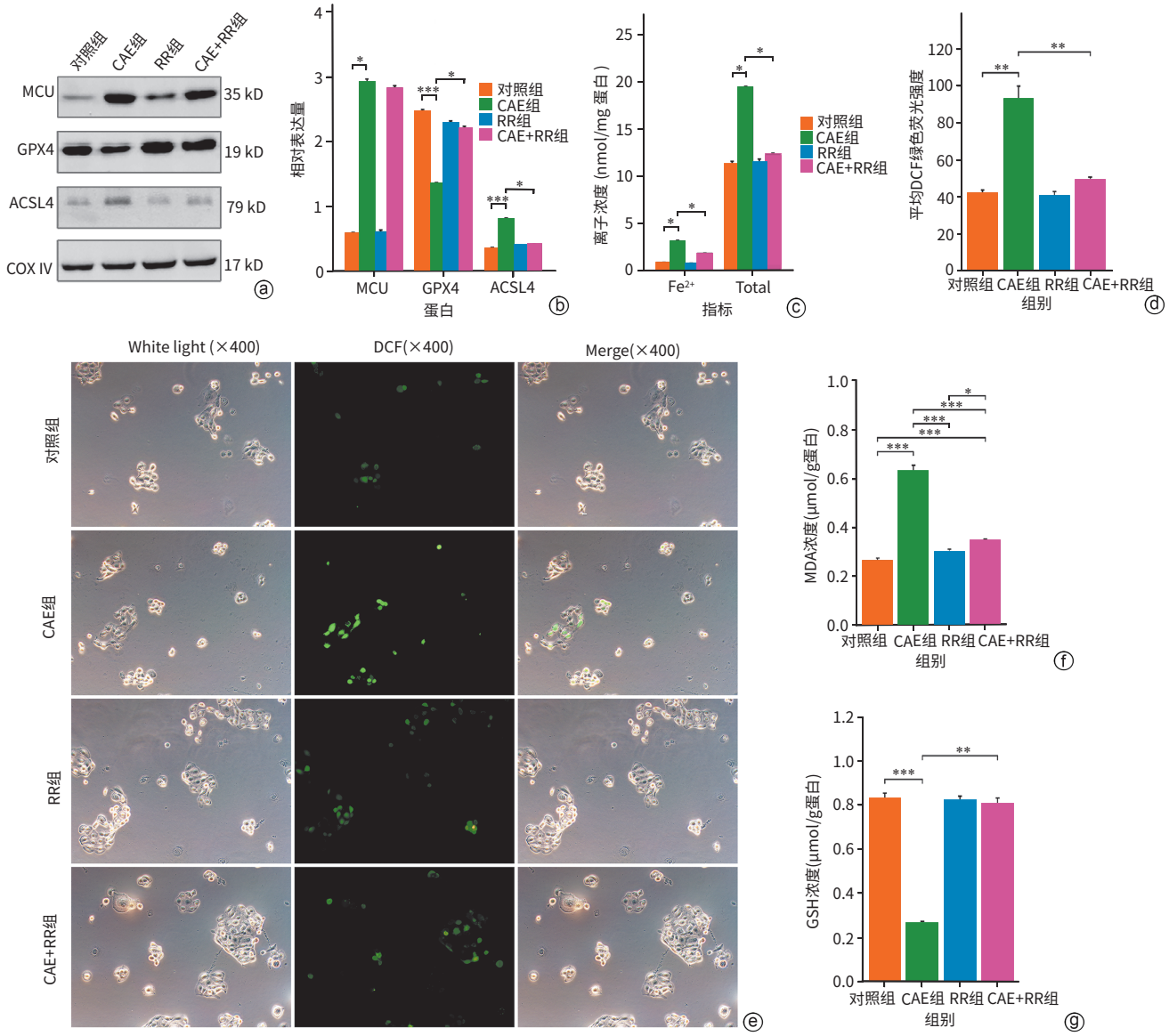
图2　不同浓度的干预剂对HPDE6-C7细胞活力的影响

Figure 2　Effects of different concentrations of pharmacological agents on HPDE6-C7 cell viability

照组微丝细胞骨架规律，呈束状排列；CAE组细胞微丝骨架疏散、解离，排列紊乱；CAE+RR组微丝则较CAE组呈现出更加规律的束状排列（图4a）。CAE组单层细胞通透性较对照组显著性升高，RR干预显著逆转了单层细胞通透性的升高（P<0.001）（图4b）。

2.2.4　氧化应激、Fe^{2+}的变化以及Fer-1和Erastin干预对上述指标的影响　与对照组相比，CAE组ROS绿色荧光强度显著增强，CAE+Fer-1组较CAE组ROS绿色荧光强度减弱，CAE+Erastin组较CAE组ROS绿色荧光强度增强（P值均<0.05）（图5a、b）。与对照组相比，CAE组MDA浓度显著增加，GSH浓度显著下降，上述变化可被Fer-1的干预逆转，而被Erastin增强（P值均<0.05）（图5c、d）。与对照组相比，CAE组Fe^{2+}浓度和总铁浓度显著增加，CAE+Fer-1组Fe^{2+}浓度和总铁浓度较CAE组降低，CAE+Erastin组Fe^{2+}浓度和总铁浓度较CAE组增加（P值均<0.05）（图5e）。

2.2.5　微丝细胞骨架、单层细胞通透性的变化以及Fer-1和Erastin干预对上述指标的影响　微丝细胞骨架观察显示，对照组微丝细胞骨架规律，呈束状排列；CAE组的细胞微丝骨架疏散、解离，排列紊乱；CAE+Fer-1组的微丝则较CAE组呈现出更加规律的束状排列，而CAE+Erastin组微丝细胞骨架排列较CAE组更加紊乱，微丝更



注：a，Western Blot条带图；b，各组MCU、GPX4和ACSL4较内参的相对表达量；c，各组细胞Fe^{2+}和总铁浓度；d，各组细胞DCF绿色荧光强度；e，不同组细胞的ROS免疫荧光图（×400）；f，各组细胞MDA浓度；g，各组细胞GSH浓度。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001。MCU，线粒体钙单向转运体；GPX4，谷胱甘肽过氧化物酶4；ACSL4，长链脂酰辅酶A合成酶4；COX Ⅳ，线粒体内参抗体；CAE，雨蛙肽；RR，线粒体钙单向转运体活性抑制剂；MDA，丙二醛；GSH，谷胱甘肽。

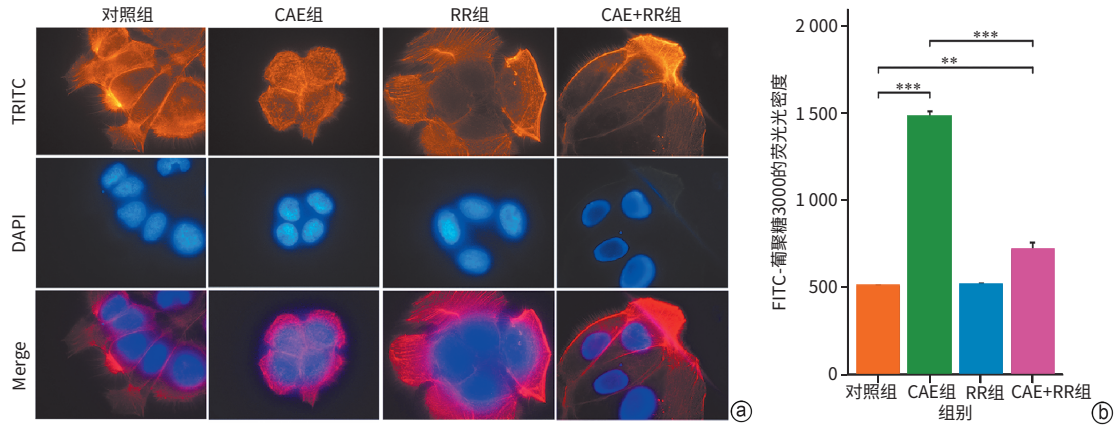
图3　各组MCU、铁死亡特征性蛋白、Fe^{2+}浓度、氧化应激指标的变化

Figure 3　Changes in MCU expression, characteristic ferroptosis proteins, iron ion concentration, and oxidative stress indicators across groups

加疏散、解离（图6a）。CAE组单层细胞通透性较对照组显著性升高，Fer-1干预能显著逆转单层细胞通透性的升高，而Erastin干预则导致单层细胞通透性更进一步升高（P值均<0.001）（图6b）。

3　讨论

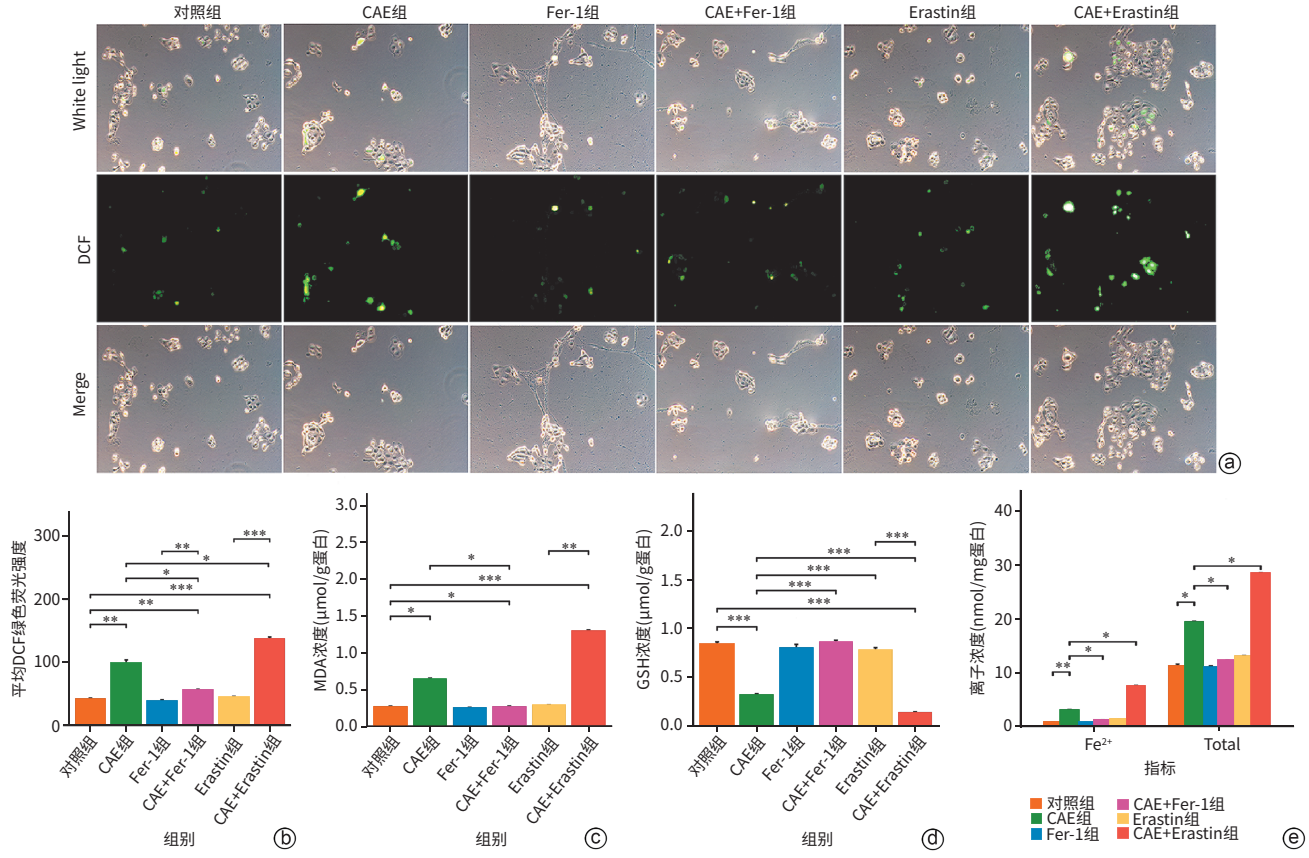
本研究结果显示，AP组小鼠胰腺导管组织和CAE组HPDE6-C7细胞MCU显著高表达，这与近期相关研究结果一致[23-24]。MCU是介导Ca^{2+}进入线粒体的主要通道。在本研究AP体外模型中，CAE刺激HPDE6-C7细胞导致线粒体钙超载，而且可以被MCU的抑制剂RR所逆转[23]。已有研究表明，MCU过表达引起的线粒体钙超载在多种疾病中可通过增强氧化应激引发一系列病理改变[25-26]。本研究中，AP组MCU显著高表达，伴随氧化应激反应增强、细胞微丝骨架破坏和单层细胞通透性升高，MCU的活性抑制剂RR能逆转上述改变，表明MCU



注：a，各组微丝细胞骨架TRITC染色的免疫荧光图（×1 000）；b，各组细胞的单层细胞通透性。**P<0.01，***P<0.001。CAE，雨蛙肽；RR，线粒体钙单向转运体活性抑制剂。

图4　各组微丝细胞骨架及单层细胞通透性的变化

Figure 4　Changes in actin cytoskeleton and monolayer cell permeability across groups



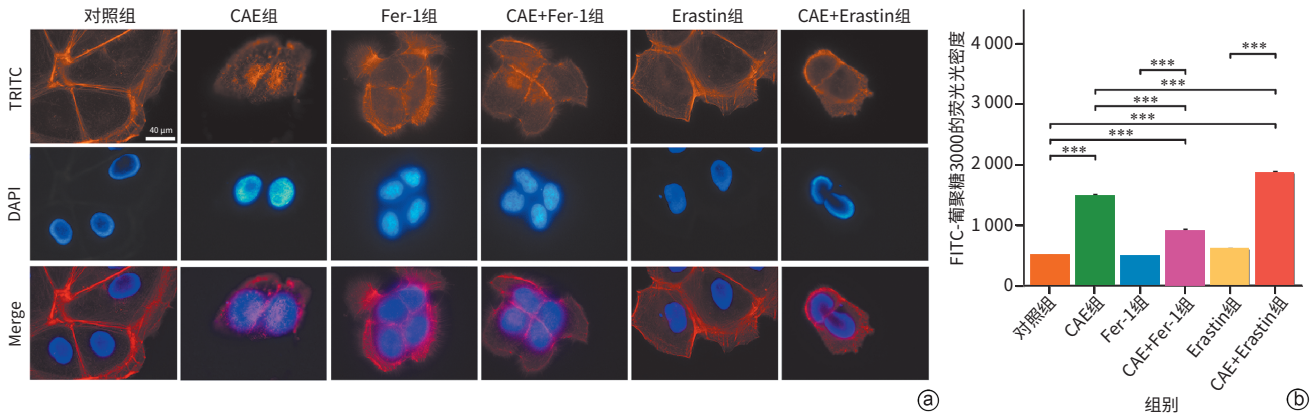
注：a，不同组细胞的ROS免疫荧光图（×400）；b，各组细胞DCF绿色荧光强度比较；c，各组细胞MDA浓度比较；d，各组细胞GSH浓度比较；e，各组细胞Fe^{2+}浓度比较。*P<0.05；**P<0.01；***P<0.001。CAE，雨蛙肽；Fer-1，铁死亡抑制剂；Erastin，铁死亡诱导剂；MDA，丙二醛；GSH，谷胱甘肽。

图5　各组氧化应激指标及Fe^{2+}的变化

Figure 5　Alterations in oxidative stress markers and iron levels among groups

诱发的线粒体钙超载在AP中具有潜在的促进氧化应激、破坏微丝细胞骨架及胰腺导管黏膜屏障功能的作用。类似地，在脓毒血症中，血管内皮细胞的微丝细胞骨架破坏、内皮细胞通透性升高，而稳定内皮细胞对脓毒血症具有保护作用[27]。本研究中MCU过表达引起后续微丝细胞骨架破坏和单层细胞通透性升高，这可能是AP发病的重要机制之一。

在胰腺导管上皮细胞癌中，MCU的过表达通过线粒



注：a，各组微丝细胞骨架TRITC染色的免疫荧光图片（×1 000）；b，各组细胞的单层细胞通透性统计比较。***P<0.001。CAE，雨蛙肽；Fer-1，铁死亡抑制剂；Erastin，铁死亡诱导剂。

图6　各组微丝细胞骨架及单层细胞通透性的变化

Figure 6　Changes in actin cytoskeleton and monolayer cell permeability across groups

体Ca^{2+}的累积促进线粒体ROS生成，加剧铁死亡[28]。此外，MCU的敲除能够降低黑色素瘤细胞对铁死亡诱导剂RSL3的敏感性[29]。本研究体内和体外实验均提示，AP发生时可能伴随铁死亡的发生，与既往研究结果一致[30-31]。MCU抑制剂RR的干预可以显著逆转CAE组HPDE6-C7细胞铁死亡特征性蛋白的改变和氧化应激反应增强，表明MCU具有潜在调控铁死亡的作用，该结果亦与既往研究结果一致[32-33]。铁死亡是一种依赖Fe^{2+}的磷脂过氧化作用驱动的细胞死亡模式，其基本驱动因素是细胞代谢过程中产生ROS和Fe^{2+}[11]。因此，推测MCU可能是通过线粒体钙超载促进氧化应激增强，进而促进铁死亡发生，但其具体机制仍需深入探讨。本研究还发现，铁死亡诱导剂可以导致CAE干预的HPDE6-C7细胞出现氧化应激增强、微丝细胞骨架进一步破坏和单层细胞通透性升高，而铁死亡的抑制剂干预则表现出相反的结果。表明铁死亡在HPDE6-C7细胞微丝细胞骨架破坏的发生过程中具有潜在的调控作用。然而，由于条件有限，本研究未能完善脂质过氧化等铁死亡关键证据的实验，此为本研究的局限性之一，后续工作需在此基础上进一步完善相关机制探索。

伦理学声明：本研究经由南昌大学第一附属医院伦理委员会批准，批号分别为CDYFY-IACUC-202311QR029和CDYFY-IACUC-202409GR018，所有实验操作均严格遵守中国国家标准《实验动物福利伦理审查指南》（GB/T 35892—2018）、ARRIVE指南2.0（PLoS Biol 18：e3000410，2020）和3R原则。

利益冲突声明：本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明：陈峭峰负责拟定写作思路，绘制图片和论文撰写；傅庆子、洪军波负责课题设计；杨慧莹、唐国都负责实验技术指导及课题设计指导；朱亮、杨真真负责文献收集整理；张石玉负责指导修改论文并最终定稿。

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] SCHEPERS NJ, BAKKER OJ, BESSELINK MG, et al. Impact of characteristics of organ failure and infected necrosis on mortality in necrotising pancreatitis[J]. Gut, 2019, 68(6): 1044-1051. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314657.

[4] YIN JL, ZHAO MM, WANG Y, et al. Analysis of dlinical characteristics and inlluencing factors of disease Prognosis in severe acute pancreatitis at different stages[J]. J Clin Exp Med, 2024, 23(7): 698-702. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2024.07.007.
殷将领，赵茗茗，王尧，等．不同时期重症急性胰腺炎临床特点及疾病转归的影响因素分析[J]．临床和实验医学杂志，2024，23(7)：698-702. DOI：10.3969/j.issn.1671-4695.2024.07.007.

[5] HABTEZION A, GUKOVSKAYA AS, PANDOL SJ. Acute pancreatitis: A multifaceted set of organelle and cellular interactions[J]. Gastroenterology, 2019, 156(7): 1941-1950. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.11.082.

[6] WALDRON RT, CHEN YF, PHAM H, et al. The Orai Ca^{2+} channel inhibitor CM4620 targets both parenchymal and immune cells to reduce inflammation in experimental acute pancreatitis[J]. J Physiol, 2019, 597(12): 3085-3105. DOI: 10.1113/JP277856.

[7] DELIERNEUX C, KOUBA S, SHANMUGHAPRIYA S, et al. Mitochondrial calcium regulation of redox signaling in cancer[J]. Cells, 2020, 9(2): 432. DOI: 10.3390/cells9020432.

[8] PENG TI, JOU MJ. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1201: 183-188. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05634.x.

[9] MUÑOZ-CASARES FC, PADILLO FJ, BRICEÑO J, et al. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas[J]. J Pineal Res, 2006, 40(3): 195-203. DOI:

10.1111/j.1600-079X.2005.00291.x.
[10] KONOK GP, THOMPSON AG. Pancreatic ductal mucosa as a protective barrier in the pathogenesis of pancreatitis[J]. Am J Surg, 1969, 117(1): 18-23. DOI: 10.1016/0002-9610(69)90280-3.
[11] JIANG XJ, STOCKWELL BR, CONRAD M. Ferroptosis: Mechanisms, biology and role in disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 266-282. DOI: 10.1038/s41580-020-00324-8.
[12] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: Process and function[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(3): 369-379. DOI: 10.1038/cdd.2015.158.
[13] YANG WS, SRIRAMARATNAM R, WELSCH ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. Cell, 2014, 156(1-2): 317-331. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.010.
[14] DIXON SJ, WINTER GE, MUSAVI LS, et al. Human haploid cell genetics reveals roles for lipid metabolism genes in nonapoptotic cell death[J]. ACS Chem Biol, 2015, 10(7): 1604-1609. DOI: 10.1021/acschembio.5b00245.
[15] DOLL S, PRONETH B, TYURINA YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(1): 91-98. DOI: 10.1038/nchembio.2239.
[16] KAGAN VE, MAO GW, QU F, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis[J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(1): 81-90. DOI: 10.1038/nchembio.2238.
[17] PARK EJ, PARK YJ, LEE SJ, et al. Whole cigarette smoke condensates induce ferroptosis in human bronchial epithelial cells[J]. Toxicol Lett, 2019, 303: 55-66. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.12.007.
[18] DAI EY, HAN L, LIU J, et al. Ferroptotic damage promotes pancreatic tumorigenesis through a TMEM173/STING-dependent DNA sensor pathway[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 6339. DOI: 10.1038/s41467-020-20154-8.
[19] FAN R, SUI JD, DONG XP, et al. Wedelolactone alleviates acute pancreatitis and associated lung injury *via* GPX4 mediated suppression of pyroptosis and ferroptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 173: 29-40. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.009.
[20] MA DL, LI C, JIANG PL, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates acute kidney injury in rats with severe acute pancreatitis[J]. Dig Dis Sci, 2021, 66(2): 483-492. DOI: 10.1007/s10620-020-06225-2.
[21] MA DL, JIANG PL, JIANG YJ, et al. Effects of lipid peroxidation-mediated ferroptosis on severe acute pancreatitis-induced intestinal barrier injury and bacterial translocation[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6644576. DOI: 10.1155/2021/6644576.
[22] van LAETHEM JL, MARCHANT A, DELVAUX A, et al. Interleukin 10 prevents necrosis in murine experimental acute pancreatitis[J]. Gastroenterology, 1995, 108(6): 1917-1922. DOI: 10.1016/0016-5085(95)90158-2.
[23] LEI Y, YANG HY, MENG N, et al. Mitochondrial calcium uniporter promotes mitophagy by regulating the PINK1/Parkin pathway in caerulein-treated pancreatic ductal epithelial cells in vitro[J]. Exp Ther Med, 2024, 27(4): 147. DOI: 10.3892/etm.2024.12435.
[24] YU XY, DAI C, ZHAO XM, et al. Ruthenium red attenuates acute pancreatitis by inhibiting MCU and improving mitochondrial function [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 635: 236-243. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.10.044.
[25] LI C, SUN JY, LING HL, et al. MCU regulating bone remodeling and osteogenic function through mitochondrial calcium homeostasis and oxidative stress alteration[J]. Free Radic Biol Med, 2025, 236: 87-97. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2025.05.001.
[26] LI ZX, RAN Q, QU C, et al. Sigma-1 receptor activation attenuates DOX-induced cardiotoxicity by alleviating endoplasmic reticulum stress and mitochondrial calcium overload via PERK and IP3R-VDAC1-MCU signaling pathways[J]. Biol Direct, 2025, 20(1): 23. DOI: 10.1186/s13062-025-00617-y.
[27] XING MY, LIANG S, CAO W, et al. Annexin A3 represses endothelial permeability and inflammation during sepsis *via* actin cytoskeleton modulation[J]. Adv Sci, 2025, 12(22): 2416904. DOI: 10.1002/advs.202416904.
[28] WANG XC, LI YZ, LI ZK, et al. Mitochondrial calcium uniporter drives metastasis and confers a targetable cystine dependency in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2022, 82(12): 2254-2268. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-3230.
[29] STEJEREAN-TODORAN I, ZIMMERMANN K, GIBHARDT CS, et al. MCU controls melanoma progression through a redox-controlled phenotype switch[J]. EMBO Rep, 2022, 23(11): e54746. DOI: 10.15252/embr.202254746.
[30] ZHANG LL, WANG KP, JIANG WR, et al. Neferine ameliorates severe acute pancreatitis-associated intestinal injury by promoting NRF2-mediated ferroptosis[J]. Int J Biol Sci, 2025, 21(7): 3247-3261. DOI: 10.7150/ijbs.112888.
[31] LI J, JIA YC, ZHANG HY, et al. Nrf2 ameliorates defective autophagic processes and thereby inhibits ferroptosis in acute pancreatitis by suppressing Beclin1-Slc7a11 complex formation[J]. Free Radic Biol Med, 2025, 230: 294-308. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2025.02.011.
[32] REN SY, WANG JY, DONG ZC, et al. Perfluorooctane sulfonate induces ferroptosis-dependent non-alcoholic steatohepatitis *via* autophagy-MCU-caused mitochondrial calcium overload and MCU-ACSL4 interaction[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 280: 116553. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.116553.
[33] LI Y, CUI H, XU WX, et al. Selenium represses microRNA-202-5p/MICU1 aixs to attenuate mercuric chloride-induced kidney ferroptosis [J]. Poult Sci, 2024, 103(8): 103891. DOI: 10.1016/j.psj.2024.103891.

收稿日期：2025-08-19；**录用日期：**2025-11-13
本文编辑：林姣

引证本文：CHEN QF, FU QZ, YANG HY, et al. Role and mechanism of mitochondrial calcium uniporter in the cytoskeleton of pancreatic ductal epithelial cells in a mouse model of acute pancreatitis[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(2): 400-408.
陈峭峰, 傅庆子, 杨慧莹, 等. 线粒体钙单向转运体在急性胰腺炎小鼠模型胰腺导管上皮细胞骨架中的作用及其机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(2): 400-408.