

• 基础研究 •

## $\alpha$ -酮戊二酸通过XRCC3诱发急性胰腺炎发病的机制研究

侯超群, 葛万里, 彭云鹏, 李 强\*

南京医科大学第一附属医院胰腺中心, 江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的: 筛选急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)潜在致病代谢物, 并基于动物及细胞模型探讨 $\alpha$ -酮戊二酸(alpha-ketoglutarate,  $\alpha$ KG)调控X线修复交叉互补3蛋白(X ray repair cross-complementing protein 3, XRCC3)诱发AP的分子机制。方法: 通过孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)研究, 结合两轮独立的Meta分析, 从遗传学角度筛选与AP发病相关的代谢物, 并采用逆方差加权(inverse variance weighted, IVW)方法评估代谢物与AP的因果效应。随后, 构建C57BL/6小鼠AP动物模型及AR42J细胞模型, 分别通过腹腔注射 $\alpha$ KG和培养基共培养的方式, 验证其对胰腺腺泡细胞损伤及炎症反应的影响。检测指标包括细胞活性、炎症因子水平、组织病理学变化。此外, 利用RNA测序分析 $\alpha$ KG处理前后AR42J细胞的全转录组差异, 并通过免疫组化、Western blot等技术验证XRCC3的表达变化及其在AP发病中的作用。结果: MR研究及Meta分析结果显示,  $\alpha$ KG与AP发病存在正向因果关系, 而吲哚丙酸(indolepropionate, INDO)则表现出潜在的保护作用。细胞实验表明, 10  $\mu$ mol/L的 $\alpha$ KG可显著抑制AR42J细胞活性, 并促进白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 $\beta$ 等炎症因子的分泌。动物模型中, 腹腔注射 $\alpha$ KG可诱导小鼠AP的发生, 表现为胰腺组织水肿、腺泡细胞损伤及血清炎症因子水平升高。全转录组测序结果表明 $\alpha$ KG通过抑制XRCC3的表达, 削弱DNA损伤修复能力, 从而加剧胰腺腺泡细胞损伤。免疫组化和Western blot显示 $\alpha$ KG处理后AR42J细胞中XRCC3表达显著下调, 此外, 过表达XRCC3可在一定程度上逆转 $\alpha$ KG对腺泡细胞的损伤作用。结论: 本研究首次在遗传学层面证实 $\alpha$ KG是AP的致病代谢物, 其通过抑制XRCC3介导的DNA修复通路, 加剧胰腺腺泡细胞损伤及炎症反应。该发现为AP的代谢机制研究提供了新视角, 提示靶向 $\alpha$ KG-XRCC3轴可能成为潜在治疗策略。

**[关键词]** 急性胰腺炎;  $\alpha$ -酮戊二酸; XRCC3; 孟德尔随机化; DNA损伤修复**[中图分类号]** R576**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2025)12-1756-10**doi:** 10.7655/NYDXBNSN250807

### Study on the mechanism of $\alpha$ -ketoglutarate inducing acute pancreatitis via XRCC3

HOU Chaoqun, GE Wanli, PENG Yunpeng, LI Qiang\*

Pancreas Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To screen potential pathogenic metabolites of acute pancreatitis (AP) and explore the molecular mechanism of  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG) regulating X ray repair cross-complementing protein 3 (XRCC3) to induce AP based on animal and cell models. **Methods:** The study first conducted a Mendelian randomization (MR) study combined with two rounds of independent Meta-analysis to screen metabolites related to the onset of AP from a genetic perspective, and used the inverse variance weighted (IVW) method to evaluate the causal effect of metabolites on AP. Subsequently, AP animal models in C57BL/6 mice and AR42J cell models were constructed. The effects of  $\alpha$ KG on pancreatic acinar cell injury and inflammatory response were verified by intraperitoneal injection of  $\alpha$ KG and co-culture with the medium, respectively. The detection indicators included cell viability, levels of inflammatory factors, and histopathological changes. In addition, RNA sequencing was used to analyze the whole transcriptome differences in AR42J cells before and after  $\alpha$ KG treatment, and the expression changes of XRCC3 and its role in the onset of AP were verified by immunohistochemistry and Western blot techniques. **Results:** The MR study and Meta-analysis results showed that  $\alpha$ KG had a positive causal relationship with the onset of acute pancreatitis, while indolepropionate (INDO) showed a potential protective effect. Cell experiments indicated that 10  $\mu$ mol/L of  $\alpha$ KG could significantly inhibit the viability of AR42J cells and promote the secretion of inflammatory factors such as interleukin-6 (IL-6) and IL-1 $\beta$ . In the animal model, intraperitoneal injection of  $\alpha$ KG could induce the

**[基金项目]** 江苏省科教能力提升工程(江苏省医学重点学科)(ZDXK202222)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: liqiang020202@163.com (ORCID: 0000-0001-5129-2603)

occurrence of AP in mice, manifested as pancreatic tissue edema, acinar cell injury, and elevated serum inflammatory factor levels. RNA-seq analysis revealed that  $\alpha$ KG exacerbated acinar cell injury by inhibiting the expression of XRCC3 and weakening the DNA damage repair ability. The expression of XRCC3 in AR42J cells was significantly down-regulated after  $\alpha$ KG treatment, which was verified by immunohistochemistry and Western blot. Additionally, overexpression of XRCC3 could partially reverse the damage effect of  $\alpha$ KG on acinar cells. **Conclusion:** This study is the first to confirm at the genetic level that  $\alpha$ KG is a pathogenic metabolite of AP, which exacerbates acinar cell injury and inflammatory response by inhibiting the XRCC3-mediated DNA repair pathway. This discovery provides a new perspective for the metabolic mechanism research of AP and suggests that targeting the  $\alpha$ KG-XRCC3 axis may be a potential therapeutic strategy.

[Key words] acute pancreatitis;  $\alpha$ -ketoglutarate; XRCC3; Mendelian randomization; DNA damage repair

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(12): 1756-1765]

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的一类消化系统急症,绝大多数病情温和且呈自限性,预后良好。但是,约有20%的患者病情会发展为中重度或重度AP,这些患者可能会出现多器官功能障碍或胰腺坏死,需要更高水平的诊疗管理(如入住重症监护病房),或需要对AP并发症进行干预(如坏死组织清除术),病死率高,临床预后极差<sup>[1-2]</sup>。最新研究表明,AP的发病率每年以2%~5%的速度递增,全球范围内每10万人的发病人数在3.4~73.4例,而我国的发病率约为60/10万<sup>[3]</sup>。虽然在过去十年中,AP管理方面的进步使其死亡率呈下降趋势,但总体人群死亡率仍保持不变<sup>[4-5]</sup>。因此,改善此类疾病的临床诊治现状迫在眉睫,而这其中的关键便是探索其发病因素及相应的发病机制。

近年来,大量的研究表明代谢物可通过多种机制参与疾病的发生发展,例如代谢物的异常蓄积或代谢途径的紊乱直接导致疾病<sup>[6-7]</sup>;细胞内外代谢物通过影响代谢酶或信号蛋白功能致细胞信号活动异常及疾病发生<sup>[8]</sup>;代谢物通过磷酸化、泛素化、乙酰化等翻译后修饰方式影响靶蛋白的功能,进而影响疾病发生<sup>[7,9]</sup>。事实上,代谢物在AP的发病过程中同样扮演关键角色。研究显示,双歧杆菌来源的乳酸通过TLR4/MyD88及NLRP3/Caspase1依赖方式抑制胰腺局部及系统性炎症反应,进而影响AP发生发展<sup>[10]</sup>;嘌呤代谢产物肌苷酸可加速骨髓生成和AP进展<sup>[11]</sup>。尽管多种代谢物已被报道可通过相应的路径参与AP的发生发展,但是目前仍缺乏研究系统性阐述血清代谢物与AP间的因果关系,何种代谢物是致病因素、何种代谢物可作为疾病诊断/预后标志物仍尚未可知。

近年来,孟德尔随机化(Mendelian randomiza-

tion, MR)研究越来越多地用于探索疾病的发病因素<sup>[12-13]</sup>。该方法的核心是利用遗传变异作为工具变量,减少传统观察性研究中混杂因素,精确推断暴露因素与结局因素间的因果关系。因此,本课题组利用MR研究在遗传层面探索血清代谢物与AP发病间的因果关系,对筛选所得的代谢物在AP动物和细胞模型中进行验证和机制探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 对象

从公开可得的全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)数据库中筛选适合MR研究的遗传变异。AP共涉及两个样本,汇总统计量取自IEU GWAS数据库。第1个样本共涉及3 022例AP, 195 144例对照;第2个样本共涉及3 798例AP, 476 104例对照。与血清代谢物相关的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)来自一项研究(UK Twin Study),共纳入7 824例,涉及480个血清代谢物<sup>[14-15]</sup>。本MR研究采取双向两样本设计,分析遵循3项核心假设:相关性、独立性和排除限制。相关性即遗传工具与暴露相关;独立性即遗传工具与混杂因素无关;排除限制即遗传工具仅通过暴露影响结局。以 $P < 5 \times 10^{-6}$ 的显著阈值选取与血清代谢物及AP相关的SNP作为工具变量(instrumental variable, IV),并通过clumping(间距10 000 kb,  $r^2 < 0.001$ )排除连锁不平衡。为避免弱工具变量偏倚,剔除统计量 $F < 10$ 的IV。

#### 1.1.2 动物与试剂

清洁级C57BL/6小鼠(雄性,4周龄,体重25 g左右),购买自南京医科大学实验动物中心,所有实验

动物均在标准实验环境下饲养。大鼠胰腺外分泌细胞即 AR42J 细胞由本课题组常规保存,最初购买自美国 ATCC。雨蛙素(Cerulein)、 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ KG)、吲哚丙酸(indolepropionate, INDO)(上海源叶生物科技有限公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、F12K 培养基(Thermo Fisher Scientific 公司,美国);抗体:X 线修复交叉互补 3 蛋白(X ray repair cross-complementing protein 3, XRCC3)、 $\beta$ 肌动蛋白( $\beta$ -actin)以及 HRP 标记抗兔和抗小鼠二抗(Proteintech 公司,美国);酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒:白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 $\beta$ 、转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor  $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)(北京欣博盛生物科技有限公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)(MCE 公司,美国);4%多聚甲醛、BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、PMSF、QuickBlock™ 阻断缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司);Lipofectamine 3000(Thermo Fisher Scientific 公司,美国);TRIzol 试剂、2 $\times$ Taq Plus Master Mix、HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR(南京诺唯赞生物科技有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物和细胞模型构建

C57BL/6 小鼠(雄性,4 周龄,体重 25 g 左右)适应性饲养 1 周后,随机分为 4 组,每组 10 只。对照组:腹腔注射等量生理盐水; $\alpha$ KG 组:腹腔注射 10 mg/kg 的  $\alpha$ KG;AP 组:造模时腹腔注射 50  $\mu$ g/kg 雨蛙素,每小时腹腔注射 1 次,共注射 10 次;AP+ INDO 组:AP 造模基础上,最后 1 次追加腹腔注射 INDO(50 mg/kg)。腹腔注射的  $\alpha$ KG 和 INDO 的浓度参考既往已有的文献报道<sup>[16-17]</sup>。动物实验符合 3R 原则,且已获得南京医科大学实验动物福利伦理委员会动物实验伦理审查批准,伦理号为: IACUC-2507054。以 AR42J 细胞为基础构建体外模型,  $\alpha$ KG 组:培养基中加入不同浓度的  $\alpha$ KG 共培养; AP 组:培养基中加入 10 nmol/L 雨蛙素共培养; INDO 组:培养基中加入 10 nmol/L 雨蛙素和不同浓度 INDO 共培养。

### 1.2.2 标本留取

血液标本:实验小鼠造模成功后,第 1 次注射  $\alpha$ KG 或雨蛙素开始 24 h 后,经眼球摘除取血法,收取血液于医用促凝管内,常温放置 30 min 后,4  $^{\circ}$ C, 3 000 r/min 离心 10 min,吸取上层血清分装于 200  $\mu$ L 离心管内,标记后存储在 -80  $^{\circ}$ C 冰箱。组织标本:小鼠眼球采血完成后,经脱颈处死小鼠。沿胸腹部正

中线解剖,充分暴露腹腔,胸腔。迅速分离胰腺组织,用 RNA Later 冲洗并将胰腺组织分成 3 部分,第一部分使用 4%多聚甲醛固定,后放置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中,剩余两部分立即分别放置于液氮罐中。细胞上清标本:6 孔板中细胞培养 24 h 后,留取培养液,离心后留取上清液检测。

### 1.2.3 CCK-8 细胞增殖检测

将 AR42J 细胞以  $3 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板,设置空白对照(无细胞培养基)及实验组( $\alpha$ KG、INDO 按预设梯度浓度处理),每组设 3 个复孔。37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,弃去原培养基,每孔加入含 10% CCK-8 试剂的无血清培养基 100  $\mu$ L,避光孵育 2 h。使用酶标仪于 450 nm 波长测定吸光度值,根据吸光度值按公式计算细胞存活率。

### 1.2.4 炎症因子检测

对细胞上清和血清分别进行炎症因子水平检测,IL-6、IL-1 $\beta$ 和 TGF- $\beta$ 1 水平根据制造商的说明书用 ELISA 试剂盒进行定量检测。

### 1.2.5 苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HQE)和免疫组化染色(immunohistochemistry, IHC)

胰腺组织在 4%多聚甲醛中固定,然后包埋于石蜡块中,切成 4  $\mu$ m 厚的切片,用于 HE 染色。免疫组化染色用于分析 XRCC3 在胰腺组织中的表达。包埋蜡块经脱蜡、水化、抗原修复等步骤后,用 XRCC3 一抗孵育过夜,冲洗后与二抗在室温下孵育 1 h。最后,加入二氨基联苯胺显色,苏木精反染色。HQE 染色和 IHC 均通过 Case Viewer 软件进行扫描和观察。

### 1.2.6 蛋白免疫印迹实验(Western blot, WB)

胰腺组织在 RIPA 裂解缓冲液和 PMSF 中裂解,随后将裂解物在 4  $^{\circ}$ C 下以 12 000 r/min 离心 15 min,获得总蛋白上清液。测定蛋白浓度后煮沸变性电泳,转移到 PVDF 膜上。用 QuickBlock™ 阻断缓冲液在室温下对膜进行 15 min 的封闭处理,然后在 4  $^{\circ}$ C 下与一抗孵育过夜。第 2 天用 TBST 洗涤 PVDF 膜,在室温下用二抗孵育 2 h,洗涤 3 次后行 ECL 化学发光试剂检测。

### 1.2.7 XRCC3 过表达质粒构建及转染

XRCC3 过表达质粒由上海吉凯基因公司设计构建。将正处于对数增长阶段的 AR42J 细胞接种至 6 孔板中,接种密度为  $2 \times 10^5$  个/孔,待次日细胞密度达到 70%~80%时使用 Lipo3000 按照说明书进行质粒转染,转染后 48 h,收集细胞并通过 WB 检测

XRCC3的表达水平。

### 1.2.8 实时荧光定量 PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, RT-qPCR)

按照 TRIzol 试剂使用说明书提取细胞总 RNA, 用逆转录试剂盒 (HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR) 将 RNA 反转录成 cDNA。采用 RT-qPCR 法, 以  $\beta$ -actin 为内参基因检测 XRCC3 的 mRNA 水平。XRCC3 上游引物序列: 5'-GCTACCGAGTGCCT-GAAGAA-3'; 下游引物序列: 5'-CAGCAGAATG-GAGTAGCCACA-3';  $\beta$ -actin 上游引物序列: 5'-AG-ATGTGATCAGCAAGCAG-3'; 下游引物序列: 5'-GC-GCAAGTTAGTTTTGTCA-3'。

### 1.2.9 转录组测序

从每个胰腺样本的 200 mg 组织中提取 RNA, 对照组和  $\alpha$ KG 组的小鼠各取 3 个独立样本送至华大基因 (深圳) 进行 RNA 测序。随后按照制造商的方案制备 cDNA 文库。构建好的文库在合格后进行质量检测 and 测序。测序获得的数据称为原始读段或原始数据。经过质量控制后, 将过滤后的干净读段与参考序列进行比对。比对完成后, 通过统计比对率、读段在参考序列上的分布等, 经过第 2 次质量控制 (比对质量控制), 对基因进行定量分析以及基于基因表达水平的各种分析 (主要包括成分、相关性、差异基因筛选等), 并针对所选样本中差异表达的基因进行基因本体论 (gene ontology, GO) 功能显著性富集分析、通路显著性富集分析、聚类、蛋白质相互作用网络

和转录因子等更深入地挖掘和分析。

### 1.3 统计学方法

本 MR 主要研究血清代谢物与 AP 的双向因果关联。以逆方差加权 (inverse variance weighted, IVW) 法为主要方法评估不同 SNP 的因果效应; 另用孟德尔随机化-Egger 回归 (Mendelian randomization-Egger regression, MR-Egger)、加权中位数、简单模式及加权模式法验证 IVW 结果。其中 MR-Egger 法通过加入截距项检测水平多效性。进一步使用 Cochran's Q 和 MR-PRESSO 评估 SNP 间异质性并识别潜在异常 SNP。所有统计分析在 R 3.6.3 中完成, 使用 TwoSampleMR 0.5.6 和 MR-PRESSO 1.0 包。后续验证实验中, 结果以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 的形式呈现, 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析, 两组间比较采用 *t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AP 血清代谢物特征

首先基于两轮独立的 MR 研究, 在遗传层面探索了血清代谢物与 AP 发病间的因果关系。研究结果显示,  $\alpha$ KG、INDO 等代谢物可能与 AP 间存在因果关系, 而后基于两轮结果的 Meta 分析进一步表明,  $\alpha$ KG 可能是该疾病的致病因素, 而 INDO 则是保护因素 (表 1、图 1)。

### 2.2 $\alpha$ KG 抑制 AR42J 细胞活性

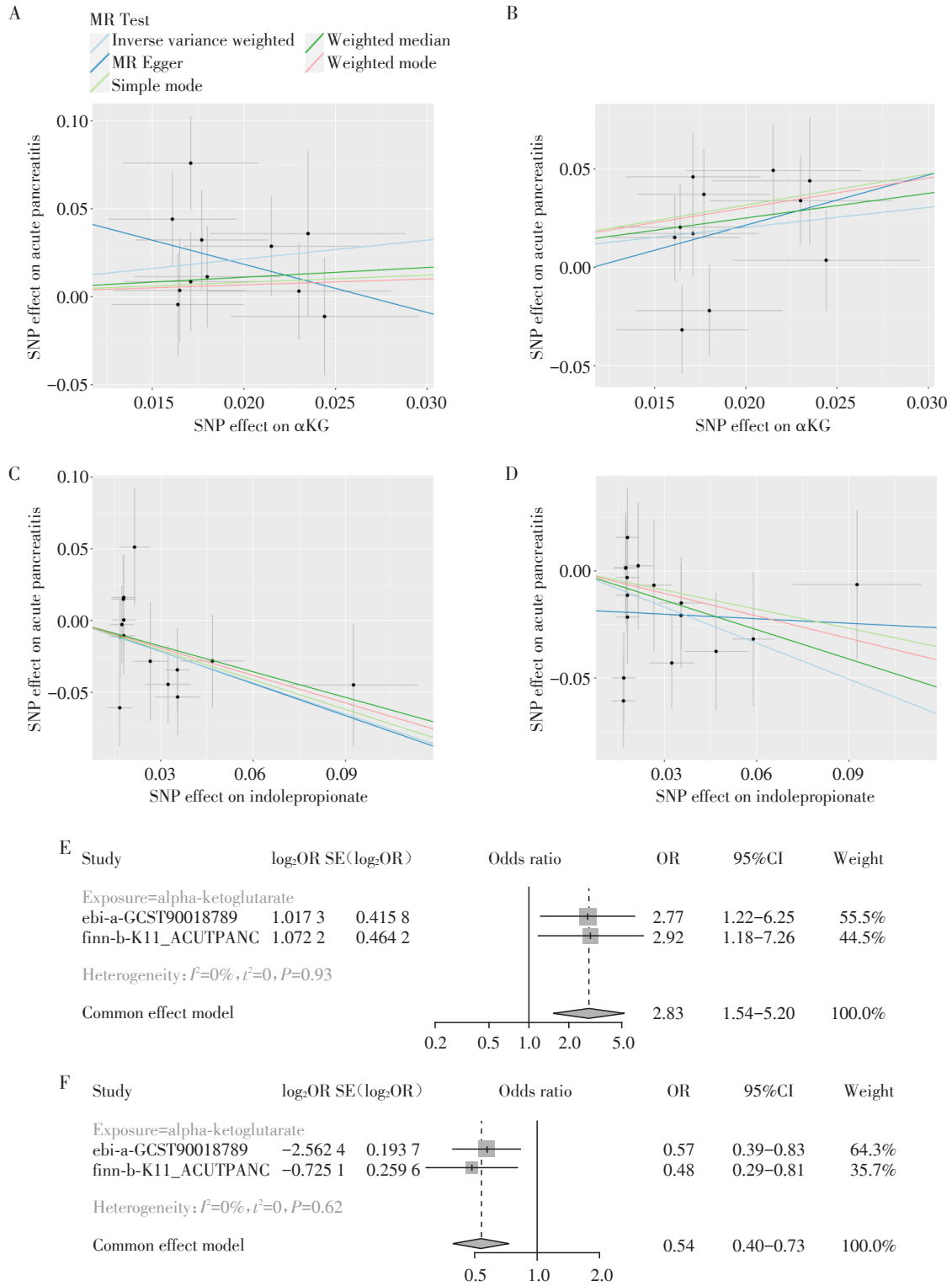
为进一步验证  $\alpha$ KG、INDO 在 AP 发病过程所发

表 1 与 AP 存在因果关系的血清代谢物 (基于两轮独立 MR 分析)

Table 1 Serum metabolites causally associated with AP (based on two rounds of independent MR analyses)

Exposure	Method	NSNP	$\beta$	SE	OR	95%CI	P
$\alpha$ KG	IVW	11	1.02	0.42	2.77	1.22-6.25	0.01
$\alpha$ KG	IVW	11	1.07	0.46	2.92	1.18-7.26	0.02
bilirubin(E, E)*	IVW	14	0.33	0.13	1.39	1.08-1.80	0.01
bilirubin(E, E)#	IVW	8	0.37	0.18	1.45	1.02-2.06	0.04
bilirubin(Z, Z)*	IVW	19	0.22	0.09	1.25	1.04-1.49	0.02
bilirubin(Z, Z)#	IVW	9	0.34	0.13	1.40	1.08-1.83	0.01
biliverdin*	IVW	27	0.26	0.13	1.29	1.01-1.66	0.04
biliverdin#	IVW	13	0.40	0.20	1.49	1.01-2.21	0.05
INDO	IVW	16	-0.56	0.19	0.57	0.39-0.83	0.00
INDO	IVW	14	-0.73	0.26	0.48	0.29-0.81	0.01
X-11530*	IVW	19	0.43	0.15	1.53	1.15-2.04	0.00
X-11530#	IVW	10	0.56	0.21	1.75	1.16-2.65	0.01
X-12329*	IVW	25	0.06	0.03	1.06	1.00-1.12	0.03
X-12329#	IVW	24	0.09	0.04	1.09	1.01-1.18	0.03

\*denotes the ebi-a-GCST90018789 dataset; #denotes the finn-b-K11\_ACUTPANC dataset. IVW: inverse variance weighted; NSNP: number of SNPs; Beta: Beta coefficient; SE: standard error; OR: odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval.



A: Analysis of the relationship between serum  $\alpha$ KG and the incidence of AP based on the ebi-a-GCST90018789 dataset, with different lines representing various statistical methods. B: Analysis of the relationship between serum  $\alpha$ KG and the incidence of AP based on the finn-b-K11\_ACUTPANC dataset. C: Analysis of the relationship between serum INDO and the incidence of AP based on the ebi-a-GCST90018789 dataset. D: Analysis of the relationship between serum INDO and the incidence of AP based on the finn-b-K11\_ACUTPANC dataset. E: Two rounds Meta-analysis of the relationship between  $\alpha$ KG and the incidence of AP based on the ebi-a-GCST90018789 and finn-b-K11\_ACUTPANC datasets. F: Two rounds Meta-analysis of the relationship between INDO and the incidence of AP based on the ebi-a-GCST90018789 and finn-b-K11\_ACUTPANC datasets.

图1  $\alpha$ KG、INDO与AP发病因果关系分析图

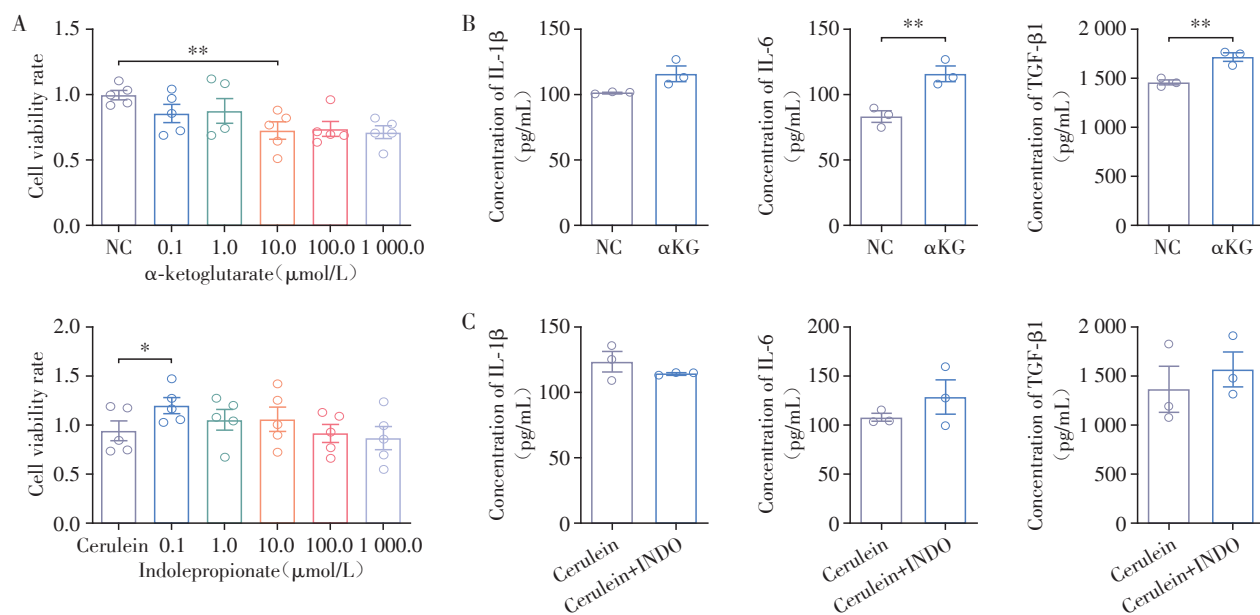
Figure 1 Causal relationship analysis of  $\alpha$ KG and INDO with the onset of AP

挥的作用, 构建了相应的细胞模型及动物模型。以AR42J细胞为基础构建细胞模型, 通过设定 $\alpha$ KG、INDO浓度梯度, 筛选各自最佳的作用浓度。CCK-8结果显示 $\alpha$ KG可抑制AR42J细胞活性, IND0可以在一定程度上对抗雨蛙素导致的AR42J细胞活性下降, 但差异无统计学意义, 最终选定10  $\mu$ mol/L的 $\alpha$ KG、0.1  $\mu$ mol/L的IND0作为最佳作用浓度用于后续实验(图2A)。

10  $\mu$ mol/L的 $\alpha$ KG、0.1  $\mu$ mol/L的IND0分别刺激AR42J细胞后, 检测细胞上清液细胞因子水平, 结果表明 $\alpha$ KG可促进细胞因子IL-6、IL-1 $\beta$ 和TGF- $\beta$ 1的分泌(图2B); 而IND0未能减少雨蛙素导致的细胞因子分泌(图2C)。

### 2.3 $\alpha$ KG促进胰腺腺泡细胞损伤诱发AP

为了进一步明确 $\alpha$ KG和IND0在AP中的作用, 在动物模型中进行了验证。结果表明, 与公认的雨



A: In AR42J cells, the optimal intervention concentrations of  $\alpha$ KG and IND0 were determined using the CCK-8 assay ( $n=5$ ); B: The effect of  $\alpha$ KG (10  $\mu$ mol/L) on the levels of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TGF- $\beta$ 1 in the culture supernatant of AR42J cells was measured by ELISA ( $n=3$ ); C: The effect of IND0 (0.1  $\mu$ mol/L) on the levels of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TGF- $\beta$ 1 in the culture supernatant of AR42J cells was measured by ELISA ( $n=3$ ). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ .

图2  $\alpha$ KG、IND0对胰腺腺泡细胞的作用

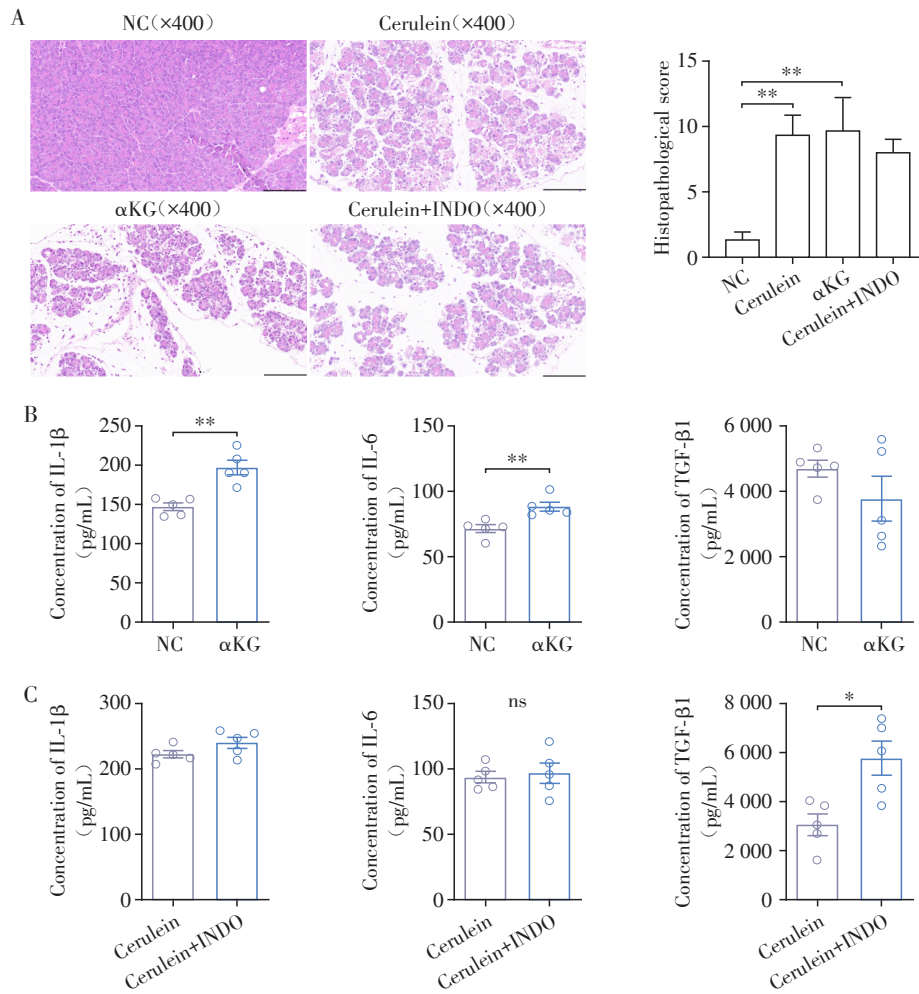
Figure 2 Effects of  $\alpha$ KG and INDO on pancreatic acinar cells

蛙素诱发动物AP模型结果相似, 腹腔注射 $\alpha$ KG也可以诱导小鼠AP的发生, 表现为胰腺组织水肿、坏死, 腺泡细胞损伤。但在雨蛙素诱发AP后, IND0的干预并没有显著改善小鼠胰腺组织炎症损伤(图3A)。小鼠血清中细胞因子的检测结果表明,  $\alpha$ KG可以显著增加血清中促炎因子IL-1 $\beta$ 与IL-6的水平(图3B), 而IND0并没有对小鼠血清中3种细胞因子产生显著影响(图3C)。因此, 腹腔注射 $\alpha$ KG可以诱发小鼠AP, 而在雨蛙素诱发AP后, IND0的干预并不能减轻小鼠AP的严重程度。

### 2.4 $\alpha$ KG通过抑制XRCC3表达促进胰腺腺泡细胞损伤

为了探索 $\alpha$ KG诱发AP的潜在机制, 利用 $\alpha$ KG处理前后的AR42J细胞进行RNA-seq, 以对比分析

两组腺泡细胞全转录组的表达差异。结果表明, 两组间基因表达存在显著差异(图4A)。而通过差异基因表达水平聚类分析和深入筛选分析, 最终筛选出了差异表达前10位的基因, 包括肌球蛋白重链9(myosin heavy chain 9, Myh9)、DNA损伤修复相关的XRCC3、含G-patch结构域蛋白8(G-patch domain containing 8, Gpatch8)等基因(图4B)。通过对这10种差异基因进行大量的文献回顾, 发现XRCC3在细胞损伤修复中有着至关重要的作用, 所以选择XRCC3作为潜在的靶点进行下一步的实验验证。在AR42J细胞层面的验证结果表明,  $\alpha$ KG干预后可以显著降低XRCC3的mRNA和蛋白表达量(图4C、D)。同样, 在动物层面的免疫组化染色验证结果表明,  $\alpha$ KG干预后可以显著降低XRCC3的阳性表达(图



A: The effects of cerulein,  $\alpha$ KG, and the combination of cerulein and INDO on the histopathological inflammatory injury of mouse pancreatic tissue after intervention (scale bar=100  $\mu$ m,  $n=6$ ); B: The effect of  $\alpha$ KG on the levels of serum cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TGF- $\beta$ 1 in mice ( $n=5$ ); C: The effect of the combination of cerulein and INDO on the levels of serum cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TGF- $\beta$ 1 in mice ( $n=5$ ). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ .

图3  $\alpha$ KG、INDO对胰腺腺泡细胞作用的体内验证

Figure 3 *In vivo* validation of the effects of  $\alpha$ KG and INDO on pancreatic acinar cells

4E)。为了进一步明确XRCC3是 $\alpha$ KG的下游靶点,在AR42J细胞中转染XRCC3过表达质粒并在蛋白表达层面进行验证(图4F)。XRCC3过表达体系构建成功后与 $\alpha$ KG共培养,结果表明,XRCC3过表达可以在一定程度上逆转 $\alpha$ KG的细胞损伤作用(图4G)。以上实验表明, $\alpha$ KG可能是通过抑制XRCC3的表达,进而诱导胰腺腺泡细胞损伤。

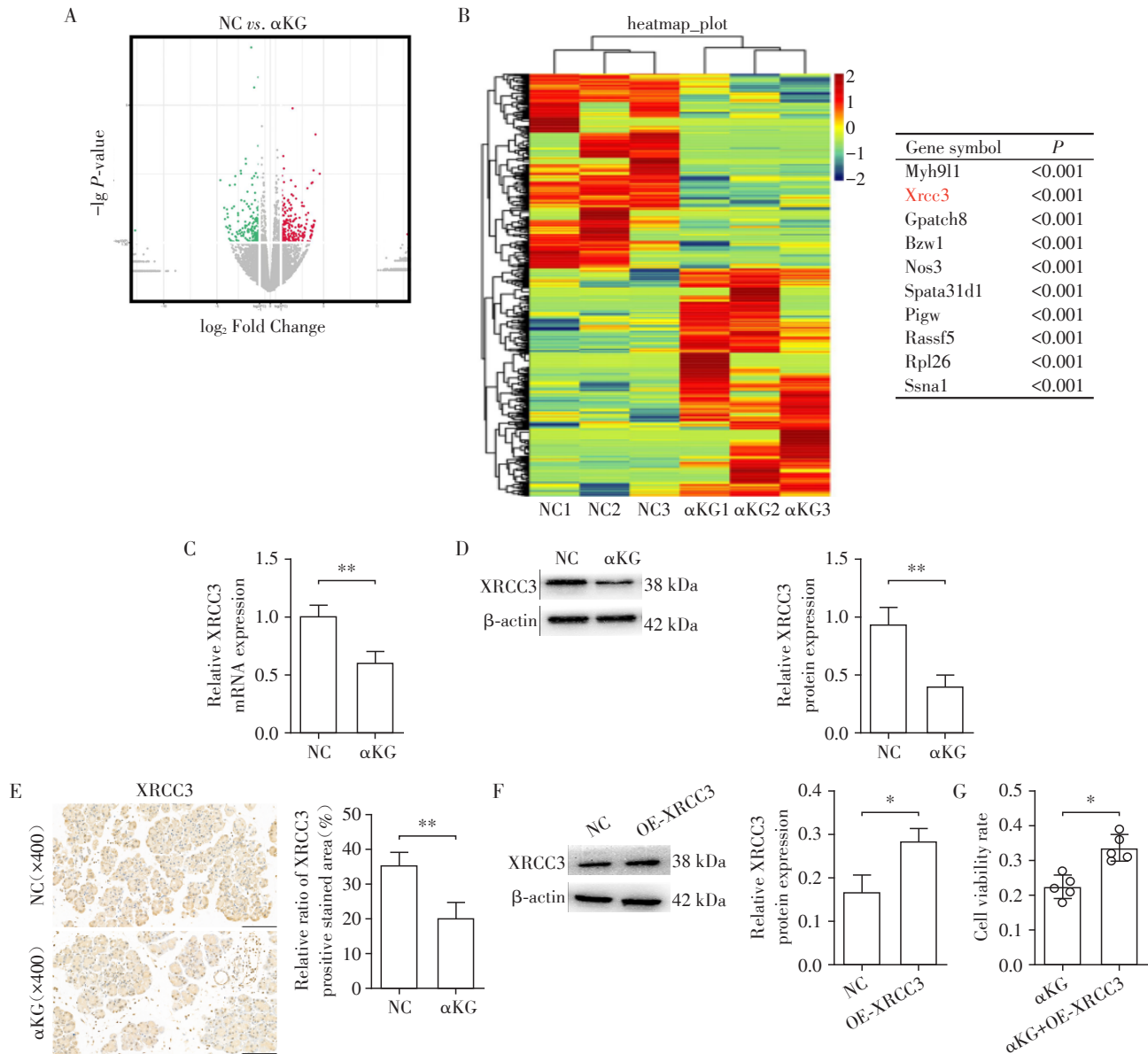
### 3 讨论

本研究基于MR方法筛选出与AP具有潜在因果关系的代谢物,并结合细胞与动物实验,系统性探讨了 $\alpha$ KG在AP发病中的作用与分子机制,尤其聚焦其对DNA损伤修复关键蛋白XRCC3的调控。研究结果提示, $\alpha$ KG不仅是AP的潜在危险代谢物,而且可以通过抑制XRCC3介导的DNA修复通路,

促进胰腺腺泡细胞损伤和炎症反应,从而推动AP的发生发展。

代谢物作为细胞代谢活动的产物,反映了机体在生理与病理状态下的功能特征。近年来,代谢组学被广泛应用于疾病标志物筛选、病理机制探索等多个方面<sup>[18-19]</sup>。然而,代谢组研究往往面临样本异质性大、影响因素多、因果关系不明确等问题。传统的观察性研究往往难以确定代谢物与疾病之间的因果方向。因此,MR方法作为一种类随机对照试验的遗传流行病学工具,在疾病机制研究中逐渐显示其独特优势<sup>[20]</sup>。MR研究利用遗传变异作为工具变量,克服了混杂因素与反向因果的干扰,有助于揭示暴露因素与疾病结果之间的真实因果关系<sup>[21-22]</sup>。

本研究通过对公开的GWAS数据进行MR分析,首次在遗传层面发现 $\alpha$ KG与AP之间存在正向



A: Based on RNA-seq, the differential expression of mRNA in the whole transcriptome of AR42J cells before and after  $\alpha$ KG treatment was compared and analyzed, presented as a volcano plot ( $n=3$ ); B: Cluster analysis of differentially expressed genes between the two groups based on differential gene expression levels ( $n=3$ ); C: RT-PCR was used to examine XRCC3 mRNA expression levels in AR42J cells ( $n=3$ ); D: Western blot was used to detect XRCC3 protein expression levels in AR42J cells ( $n=3$ ); E: IHC was performed to detect XRCC3 protein expression levels in mouse pancreatic tissue (scale bar=100  $\mu$ m,  $n=6$ ); F: In AR42J cells, Western blot was used to detect changes in XRCC3 protein expression after XRCC3 overexpression ( $n=3$ ); G: After overexpressing XRCC3 and co-culturing with  $\alpha$ KG, CCK-8 was used to measure AR42J cell viability ( $n=3$ ). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ .

图4  $\alpha$ KG通过抑制XRCC3表达诱导胰腺腺泡细胞损伤

Figure 4  $\alpha$ KG induced pancreatic acinar cell injury by suppressing XRCC3 expression

因果关系,提示其可能作为致病因子促进AP的发生。同时也发现INDO可能作为保护性代谢物参与抗炎过程。此发现不仅丰富了AP的潜在代谢机制图谱,也为进一步研究提供了方向。 $\alpha$ KG是三羧酸循环中的关键中间产物,广泛参与能量代谢、氨基酸合成和氧化稳态调控等生物过程<sup>[23-24]</sup>。近年来,越来越多的研究发现 $\alpha$ KG具有复杂的双向生物学效应,其不同细胞类型和病理背景中可能发挥完

全不同的功能。例如, $\alpha$ KG通过激活AMPK-PGC-1 $\alpha$ /Nrf2通路预防高脂血症诱导的脂肪肝线粒体功能障碍和氧化应激<sup>[25]</sup>。其还能作为重要的信号分子介导免疫调节和细胞分化<sup>[26]</sup>。然而,本研究发现在AP细胞及动物模型中,外源性补充 $\alpha$ KG反而可诱导胰腺组织水肿、腺泡细胞损伤及促炎因子(如IL-6、TGF- $\beta$ 1)水平升高,提示其在AP背景下可能具有促炎、致病作用。这一结果提示,在急性炎症反

应中,  $\alpha$ KG 的功能可能由有益转向有害, 其机制亟待进一步探讨。

转录组测序和后续分子验证实验结果提示,  $\alpha$ KG 的致病作用可能部分通过抑制 DNA 修复通路实现。在所有差异表达基因中, DNA 损伤修复相关基因 XRCC3 的下调最为突出。XRCC3 属于 RAD51 家族, 是同源重组修复通路的重要成员, 负责修复双链 DNA 断裂。既往研究表明, XRCC3 的缺失或表达下降可导致细胞对氧化应激、放疗化疗等损伤因素的易感性增加, 甚至诱导细胞凋亡或恶性转化<sup>[27-28]</sup>。本研究发现, 在  $\alpha$ KG 处理的 AR42J 细胞及小鼠胰腺组织中, XRCC3 蛋白表达水平显著下降, 提示其可能成为  $\alpha$ KG 作用的重要靶点。更为重要的是, XRCC3 的过表达可在一定程度上逆转  $\alpha$ KG 对腺泡细胞的损伤作用, 进一步证实其在 AP 发病过程中的关键调控作用。因此推测, 在 AP 病理状态下,  $\alpha$ KG 积聚可通过表观调控、转录或蛋白质翻译等方式抑制 XRCC3 表达, 削弱细胞对 DNA 损伤的修复能力, 从而诱导细胞凋亡、释放炎症因子并加重胰腺组织损伤。

本研究初步观察到 INDO 具有一定的保护作用, 尽管其在动物实验和细胞实验中的作用尚未达到统计学差异, 但其作为色氨酸代谢产物, 在已有研究中被证实具有抗炎、抗氧化、保护屏障等多种生物学活性<sup>[29]</sup>。尤其在肠道微生态研究中, 吡啶衍生物可通过调节免疫微环境, 从而发挥抗炎作用<sup>[30]</sup>。虽然在本研究模型中, INDO 未能显著改善雨蛙素诱导的 AP 病理变化, 但这可能与其剂量、作用时间、给药方式等因素有关。未来研究应进一步优化实验设计, 探索其真实作用机制, 明确其是否能作为潜在的代谢治疗靶点或干预手段。

本研究最大的亮点在于将 MR 方法与实验验证相结合, 首次在遗传因果层面明确了  $\alpha$ KG 与 AP 发病之间的正向关系, 突破了传统代谢组学研究的观察性限制。同时构建了细胞和动物模型系统验证这一因果关系, 并深入探讨其可能机制, 为后续机制研究和药物靶点筛选提供了理论依据。然而, 研究仍存在一定局限性。第一, MR 研究本质上仍依赖于 GWAS 数据库, 其结果受限于样本量、种群结构及工具变量的选择准确性。第二, 尽管验证了  $\alpha$ KG 对胰腺细胞的直接损伤作用, 但其具体作用靶点及调控机制尚需进一步探讨, 如是否涉及表观遗传修饰、氧化应激通路等。第三, XRCC3 的下调是否由  $\alpha$ KG 诱导的特异性效应还是继发于细胞损伤仍未明确, 需通过 CRISPR/Cas9 等技术进一步探讨因果关系。

在临床方面, AP 作为一种高发高致残率的急腹症, 其早期识别及干预至关重要。若未来研究进一步证实  $\alpha$ KG 在 AP 早期即呈持续升高状态, 则其有望成为一种新的预测标志物。同时, XRCC3 作为  $\alpha$ KG 作用的下游通路, 其表达水平的动态变化也可作为预后评估或靶向干预的依据。此外, 调控体内  $\alpha$ KG 水平的干预手段, 如靶向代谢通路的酶抑制剂、肠道微生物调节剂等, 亦可能成为新的治疗策略。然而, 考虑到  $\alpha$ KG 在正常细胞功能中的重要作用, 其治疗窗口、安全剂量不良反应等仍需充分研究。

总之, 本研究为 AP 的代谢机制研究提供了新思路, 拓展了代谢物在炎症性疾病中的功能认知。未来应通过更大样本量、多中心、多组学整合研究进一步验证和完善相关发现, 为 AP 的精准防治提供理论支持。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突。

#### Conflict of Interests:

All the authors declare no conflict of interests.

#### 作者贡献声明:

侯超群负责实验研究、数据分析与文章撰写; 葛万里负责孟德尔随机化研究, 参与实验研究; 彭云鹏负责数据复核及分析指导; 李强负责研究设计及数据审查、监管。

#### Author's Contributions:

HOU Chaoqun was responsible for experimental research, data analysis and article writing. GE Wanli was in charge of Mendelian randomization research and participated in experimental studies. PENG Yunpeng was responsible for data review and analysis guidance. LI Qiang was responsible for research design, data review and supervision.

#### [参考文献]

- [1] DENG H Z, PENG K X, ZHANG L, et al. Clinical outcomes in a multicenter cohort involving 919 patients with hypertriglyceridemia - associated acute pancreatitis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2025, 120(10): 2405-2414
- [2] TRIKUDANATHAN G, YAZICI C, EVANS PHILLIPS A, et al. Diagnosis and management of acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2024, 167(4): 673-688
- [3] MEDEROS M A, REBER H A, GIRGIS M D. Acute pancreatitis: a review [J]. *JAMA*, 2021, 325(4): 382-390
- [4] PEERY A F, CROCKETT S D, MURPHY C C, et al. Burden and cost of gastrointestinal, liver, and pancreatic diseases in the United States: update 2018 [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(1): 254-272
- [5] WALL I, BADALOV N, BARADARIAN R, et al. De-

- creased mortality in acute pancreatitis related to early aggressive hydration[J]. *Pancreas*, 2011, 40(4): 547-550
- [6] DOU X F, FU Q, LONG Q L, et al. PDK4-dependent hypercatabolism and lactate production of senescent cells promotes cancer malignancy [J]. *Nat Metab*, 2023, 5(11): 1887-1910
- [7] LI X L, YANG Y Y, ZHANG B, et al. Correction: Lactate metabolism in human health and disease [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2022, 7: 372
- [8] SZWED A, KIM E, JACINTO E. Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2 [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(3): 1371-1426
- [9] BOLLONG M J, LEE G, COUKOS J S, et al. A metabolite-derived protein modification integrates glycolysis with KE-AP1 - NRF2 signalling [J]. *Nature*, 2018, 562 (7728) : 600-604
- [10] LI H, XIE J Y, GUO X L, et al. Bifidobacterium spp. and their metabolite lactate protect against acute pancreatitis *via* inhibition of pancreatic and systemic inflammatory responses [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2127456
- [11] LUO X M, LAM S M, DONG Y, et al. The purine metabolite inosine monophosphate accelerates myelopoiesis and acute pancreatitis progression [J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1): 1088
- [12] BIRNEY E. Mendelian randomization [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2021: a041302
- [13] 沈笑荔, 姜 玥, 何炎芮, 等. 端粒长度与食管癌发生风险的孟德尔随机化研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(4): 496-501  
SHEN X L, JIANG Y, HE Y R, et al. Mendelian randomization study of telomere length and risk of esophageal cancer [J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2020, 40(4): 496-501
- [14] DAVIES N M, HOLMES M V, DAVEY SMITH G. Reading Mendelian randomisation studies: a guide, glossary, and checklist for clinicians [J]. *BMJ*, 2018, 362: k601
- [15] EMDIN C A, KHERA A V, KATHIRESAN S. Mendelian randomization [J]. *JAMA*, 2017, 318(19): 1925
- [16] YUAN Y X, XU P W, JIANG Q Y, et al. Exercise-induced  $\alpha$ -ketoglutaric acid stimulates muscle hypertrophy and fat loss through OXGR1 - dependent adrenal activation [J]. *EMBO J*, 2020, 39(7): e103304
- [17] ZHOU X, WU X B, WU Y, et al. Indole-3-propionic acid, a gut microbiota metabolite, protects against the development of postoperative delirium [J]. *Ann Surg*, 2023, 278(6): e1164-e1174
- [18] CHENG C X, XU F Z, PAN X F, et al. Genetic mapping of serum metabolome to chronic diseases among Han Chinese [J]. *Cell Genom*, 2025, 5(2): 100743
- [19] TAN E Y, MUTHIAH M D, SANYAL A J. Metabolomics at the cutting edge of risk prediction of MASLD [J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(12): 101853
- [20] FERENC B A, HOLMES M V, SMITH G D. Using mendelian randomization to improve the design of randomized trials [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2021, 11(7): a040980
- [21] LARSSON S C, BUTTERWORTH A S, BURGESS S. Mendelian randomization for cardiovascular diseases: principles and applications [J]. *Eur Heart J*, 2023, 44 (47) : 4913-4924
- [22] LI S F, GONG M J. Mendelian randomisation analysis reveals the possible causal relationship between infections, microbiota and clinical disease [J]. *Gut*, 2024, 73 (7) : 1216-1217
- [23] ASADI SHAHMIRZADI A, EDGAR D, LIAO C Y, et al. Alpha -ketoglutarate, an endogenous metabolite, extends lifespan and compresses morbidity in aging mice [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(3): 447-456.e6
- [24] CHAVES-PEREZ A, MILLMAN S E, JANAKI-RAMAN S, et al. Publisher Correction: Metabolic adaptations direct cell fate during tissue regeneration [J]. *Nature*, 2025, 643(8072): E15
- [25] CHENG D Y, ZHANG M, ZHENG Y Z, et al.  $\alpha$ -Ketoglutarate prevents hyperlipidemia - induced fatty liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress by activating the AMPK - pgc - 1 $\alpha$ /Nrf2 pathway [J]. *Redox Biol*, 2024, 74: 103230
- [26] CAI Z N, LI W, HAGER S, et al. Targeting PHGDH reverses the immunosuppressive phenotype of tumor-associated macrophages through  $\alpha$ -ketoglutarate and mTORC1 signaling [J]. *Cell Mol Immunol*, 2024, 21(5): 448-465
- [27] LONGO M A, ROY S, CHEN Y, et al. RAD51C-XRCC3 structure and cancer patient mutations define DNA replication roles [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4445
- [28] OZORAN E, TRABULUS F D C, ERHAN D, et al. Association of XRCC3, XRCC4, BAX, and BCL-2 polymorphisms with the risk of breast cancer [J]. *Int J Breast Cancer*, 2022, 2022: 5817841
- [29] SEHGAL R, DE MELLO V D, MÄNNISTÖ V, et al. Indolepropionic acid, a gut bacteria - produced tryptophan metabolite and the risk of type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Nutrients*, 2022, 14(21): 4695
- [30] SINHA A K, LAURSEN M F, BRINCK J E, et al. Dietary fibre directs microbial tryptophan metabolism *via* metabolic interactions in the gut microbiota [J]. *Nat Microbiol*, 2024, 9(8): 1964-1978