

## • 研究论文 •

## IMM-H004 对小鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及其机制

李芳芳, 周 欣, 闫 旭, 楚世峰, 陈乃宏\*

(中国医学科学院药物研究所, 天然活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 探究香豆素类衍生物 IMM-H004 对小鼠肝脏缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI) 的保护作用及其机制。本文中所有动物实验都获得中国医学科学院药物研究所伦理学委员会批准。实验分为 3 组, 假手术组、模型组和 IMM-H004 给药组, 检测各组的血清生化指标和病理情况。qPCR 检测炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的 mRNA 含量, 免疫组织化学和免疫荧光检测中性粒细胞浸润的情况, Western blot 检测 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体通路相关蛋白的表达。IMM-H004 可显著降低 HIRI 过程中谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的含量, 病理结果提示 IMM-H004 给药组肝组织空泡性坏死程度较模型组显著减轻, 炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的 mRNA 水平与模型组相比显著降低。免疫组化和免疫荧光的结果表明, IMM-H004 可显著减少中性粒细胞的聚集。Western blot 的结果显示, IMM-H004 可显著降低 NLRP3、衔接蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1 (cysteiny aspartate specific proteinase-1, caspase-1)、IL-1 $\beta$  的蛋白水平。综上所述, IMM-H004 对小鼠 HIRI 有显著的保护作用, 其保护作用与降低 HIRI 过程中炎症因子 mRNA 的表达, 抑制中性粒细胞的聚集以及抑制 NLRP3 炎症小体通路的激活相关。

**关键词:** 肝脏缺血再灌注损伤; IMM-H004; 中性粒细胞; NLRP3 炎症小体

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)08-2217-06

## The protective role of IMM-H004 on hepatic ischemia-reperfusion injury in mice

LI Fang-fang, ZHOU Xin, YAN Xu, CHU Shi-feng, CHEN Nai-hong\*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**Abstract:** This study investigates the protective role of IMM-H004, a novel coumarin derivative, on hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI) in mice. All animal experiments in this paper have been approved by the Ethics Committee of Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. The experimental animals were divided into three groups, including sham group, model group, and IMM-H004 treatment group. Serum biochemical indicators were detected and H&E staining was used to assess liver damage. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed to analysis the mRNA content of inflammatory factors. Immunohistochemistry and immunofluorescence were used to observe neutrophil infiltration. Western blot was used to examine the protein levels of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein (ASC), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (caspase-1), and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). The results showed that IMM-H004 could significantly reduce the serum levels of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), lactate dehydrogenase (LDH). H&E results

收稿日期: 2021-02-26; 修回日期: 2021-03-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81730096); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2018ZX09711001-002-007).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165177, E-mail: chennh@imm.ac.cn

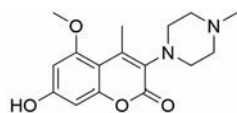
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0271

showed IMM-H004 could alleviate liver damage caused by HIRI. The mRNA expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , and interleukin-6 (IL-6) were decreased by IMM-H004 administration. Meanwhile, IMM-H004 could markedly inhibit neutrophil infiltration. Furthermore, IMM-H004 could significantly down-regulate the protein expression of NLRP3, ASC, caspase-1, and IL-1 $\beta$ , inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome pathway. Our results confirmed that IMM-H004 could protect mice from HIRI and provide a theoretical foundation for IMM-H004 application for treating HIRI.

**Key words:** hepatic ischemia-reperfusion injury; IMM-H004; neutrophil; NLRP3 inflammasome

肝脏缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI) 常见于肝脏外科手术过程中, 如肝部分切除术和肝移植等。HIRI 可导致早期异体移植功能障碍或原发性无功能, 并导致慢性移植排斥反应或病毒性肝炎复发<sup>[1]</sup>, 其病理生理过程复杂, 主要包括短暂的血流阻断和恢复血流供应, 并伴随着氧自由基的产生、细胞因子/趋化因子的释放、黏附分子的表达上调等, 最终导致细胞和组织器官的功能障碍<sup>[2]</sup>。目前, 还没有特定的针对减轻 HIRI 的治疗方法, 进一步研究其发病机制及寻找有效的治疗药物刻不容缓<sup>[3]</sup>。趋化因子是一类能够吸引免疫细胞迁移的细胞因子, 参与多种炎症反应以及病理进程。在本课题组前期的研究中发现, 趋化素样因子 1 (chemokine-like factor 1, CKLF1) 在 HIRI 中显著升高, 抑制 CKLF1 可通过抑制炎症反应及中性粒细胞的聚集降低肝脏损伤<sup>[4]</sup>。以上结果提示, 抑制 CKLF1 为缓解 HIRI 提供了一个新的思路。

化合物 7-羟基-5-甲氧基-4-甲基-3-(4-甲基哌嗪-1-基)-香豆素 (IMM-H004) 是一种新型的香豆素类衍生物, 是以 CKLF1 为靶点, 采用钙瞬变模型筛选并经过结构优化得到的 CKLF1 的竞争性拮抗剂, 结构见图 1。本实验室前期的研究发现, IMM-H004 对永久性局灶性缺血性脑损伤<sup>[5]</sup>和短暂性全脑缺血/再灌注损伤<sup>[6]</sup>均具有很好的保护作用。IMM-H004 还可以改善全脑缺血造成的海马 CA1 区细胞的丢失以及空间学习记忆障碍<sup>[7]</sup>, 降低脑缺血再灌注损伤中的炎症反应<sup>[8]</sup>。但是其在肝脏缺血再灌注损伤中的作用尚不明确, 因此本实验的目的就是探究 IMM-H004 对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。



**Figure 1** The chemical structure of IMM-H004

## 材料与方法

**实验动物** SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 (6~8 周, 体重 18~20 g) 购自北京华阜康生物技术股份有限公司,

许可证号: SCXK (京) 2020-0004, 饲养于中国医学科学院药物研究所动物房。所有动物实验都获得中国医学科学院药物研究所实验动物管理与动物福利伦理委员会批准。室温  $22 \pm 2$  °C, 相对湿度  $55\% \pm 5\%$ , 12 h/12 h 明暗交替。

**主要药品及试剂** IMM-H004 由中国医学科学院药物研究所合成室提供。反转录试剂盒、qPCR 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。qPCR 引物合成自北京擎科新业生物技术有限公司, 引物序列见表 1。RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 超敏发光液购自北京普利莱基因技术有限公司。髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 抗体、NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 抗体购自 Abcam 公司。衔接蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 抗体、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1 (cysteinyI aspartate specific proteinase-1, caspase-1) 抗体购自 Santa Cruz 公司。白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 抗体购自 ABclonal 公司。丙氨酸氨基转移酶 (alanine transaminase, ALT) 测定试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶/谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 测定试剂盒、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 测定试剂盒购自中生北控生物科技有限公司。

**Table 1** Primers for qPCR analysis. IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ ; IL-6: Interleukin-6; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$

Gene	Primer (5'-3')
IL-1 $\beta$	GTGGCAGCTACCTGTGTCTT
	GGAGCCTGTAGTGCAGTTGT
IL-6	TCCAGTTGCCTTCTGGGAC
	GACAGGTCTGTGGGAGTGG
TNF- $\alpha$	AGGCACTCCCCAAAAGATG
	TGAGGGTCTGGGCCATAGAA
$\beta$ -Actin	GAGACCTCAACACCCACAGC
	CCACAGGATTCCATACCCAA

**小鼠肝脏缺血再灌注损伤模型的建立** 将小鼠随机分为 3 组, 假手术组、模型组和 IMM-H004 组, 每组 10 只, IMM-H004 组于造模前 7 天尾静脉注射  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  IMM-H004, 连续 7 天。假手术组和模型组注射等量生理盐水。造模当天, 小鼠腹腔注射 4% 水合氯醛进行

麻醉,用血管夹夹闭肝左叶和中叶的血管造成肝脏缺血,30 min后松开血管夹恢复肝脏血流。再灌注后,IMM-H004组立即尾静脉注射一次IMM-H004,假手术组和模型组注射等量生理盐水。再灌注6 h后,取血及肝组织标本。

**血清生化指标检测** 将血液样本室温静置1 h,4 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,分离血清,利用全自动生化分析仪测定小鼠血清中ALT、AST、LDH的含量。

**肝脏病理切片** 取肝组织固定于多聚甲醛溶液中,固定24 h后进行常规石蜡切片和H&E染色,显微镜下观察,采集图像。

**免疫组织化学检测** 石蜡切片经二甲苯和梯度乙醇进行脱蜡,经过常规抗原修复、打孔、灭活、封闭等操作后,每个样本滴加50 μL稀释后的抗体,4℃孵育过夜,漂洗3次,滴加HRP标记的二抗,室温孵育2 h,漂洗3次,DAB显色,滴加苏木素使细胞核染色,脱水封片,显微镜下观察,采集图像。

**免疫荧光检测** 石蜡切片经二甲苯和梯度乙醇进行脱蜡,经过常规抗原修复、打孔、封闭等操作后,每个样本滴加50 μL稀释后的抗体,4℃孵育过夜,漂洗3次,滴加荧光标记的二抗和Hoechst 33342,室温孵育2 h,漂洗后封片,于荧光显微镜下观察。

**Real-time quantitative PCR分析** 取100 mg冻存的肝组织加入1 mL Trizol提取RNA,反转录合成cDNA,以cDNA为模板进行实时荧光定量PCR检测。以β-actin为内参,计算2<sup>-ΔΔCt</sup>值。

**Western blot检测蛋白表达** 取100 mg肝组织加入1 mL裂解液提取总蛋白,用BCA法进行蛋白定量。

加入上样缓冲液后,100℃处理10 min进行变性。采用SDS-PAGE电泳,电泳后将蛋白转印至PVDF膜,室温封闭1 h。加入相应抗体4℃孵育过夜,TBST清洗3次,二抗室温孵育2 h,TBST清洗3次,加入ECL发光液显影。使用Quality one分析软件对蛋白条带进行灰度分析。

**统计学分析** 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用GraphPad Prism 8.0统计分析软件进行统计分析。数据组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)结合Tukey检验,以 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

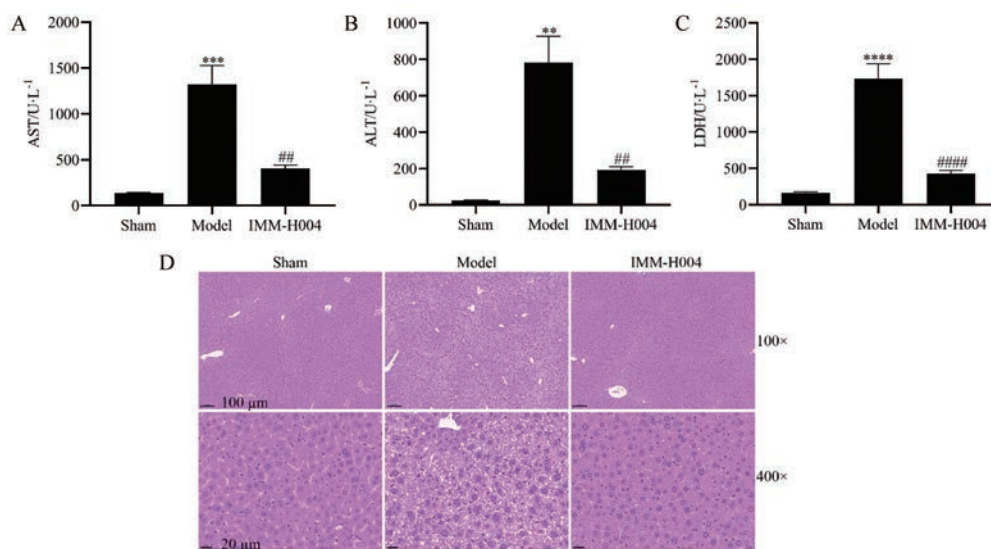
## 结果

### 1 IMM-H004对HIRI有显著的保护作用

如图2A~C所示,模型组小鼠血清中ALT、AST和LDH的含量与假手术组相比显著升高,提示造模成功。IMM-H004给药可降低小鼠HIRI后血清生化指标,与模型组相比有显著性差异,提示IMM-H004对HIRI有显著的保护作用。H&E染色的结果与生化结果一致,空白组小鼠肝组织结构清晰,细胞形态完整。模型组可见大量的空泡样病变,肝细胞坏死以及炎症细胞浸润的现象,而IMM-H004给药组小鼠肝组织形态较完整,空泡性坏死程度较轻,整体损伤较模型组明显减轻,如图2D,提示IMM-H004可减轻HIRI造成的肝脏损伤。

### 2 IMM-H004可显著降低HIRI过程中炎症因子的表达

利用实时荧光定量PCR检测HIRI过程中炎症因子的表达,结果显示模型组肝组织中TNF-α、IL-1β



**Figure 2** The protective effect of IMM-H004 on hepatic ischemia reperfusion injury (HIRI). The level of aspartate transaminase (AST, A), alanine transaminase (ALT, B), and lactate dehydrogenase (LDH, C) in serum; D: Representative images of hematoxylin and eosin (H&E) staining results.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs sham group; ## $P < 0.01$ , #### $P < 0.0001$  vs model group

和 IL-6 的 mRNA 表达与假手术组相比显著升高, 而 IMM-H004 可显著降低 HIRI 过程中炎症因子的 mRNA 水平, 与模型组相比具有统计学差异 (图 3), 提示 IMM-H004 可显著降低 HIRI 过程中的炎症反应。

### 3 IMM-H004 可显著降低 HIRI 过程中的中性粒细胞浸润

利用免疫组化染色检测小鼠肝组织 MPO 的表达, 结果显示, 模型组 MPO 阳性细胞数显著增多, 而 IMM-H004 组 MPO 阳性细胞数显著减少 (图 4A、B)。免疫荧光的结果与免疫组化的结果一致 (图 4C、D)。以上结果提示, IMM-H004 可显著降低 HIRI 过程中的中性粒细胞浸润。

### 4 IMM-H004 可显著抑制 HIRI 过程中 NLRP3 炎症小体通路的激活

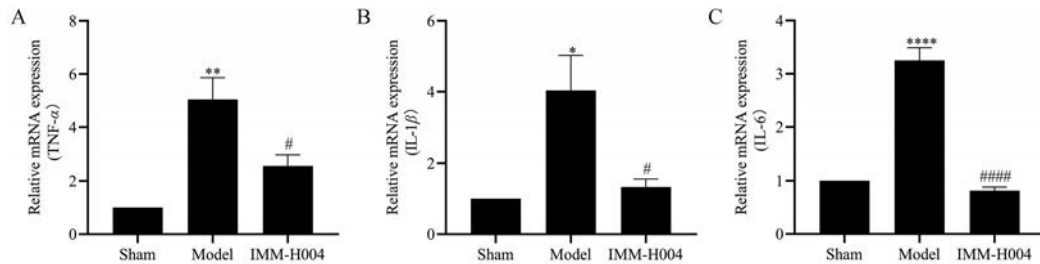
利用 Western blot 检测 NLRP3 炎症小体通路相关蛋白的水平, 结果显示, 模型组 NLRP3、ASC、caspase-1 和 IL-1 $\beta$  的蛋白表达显著升高, IMM-H004 可显著降低 NLRP3、ASC、caspase-1 和 IL-1 $\beta$  的蛋白含量 (图 5), 提示 IMM-H004 可抑制 HIRI 过程中 NLRP3 炎症小体通

路的激活。

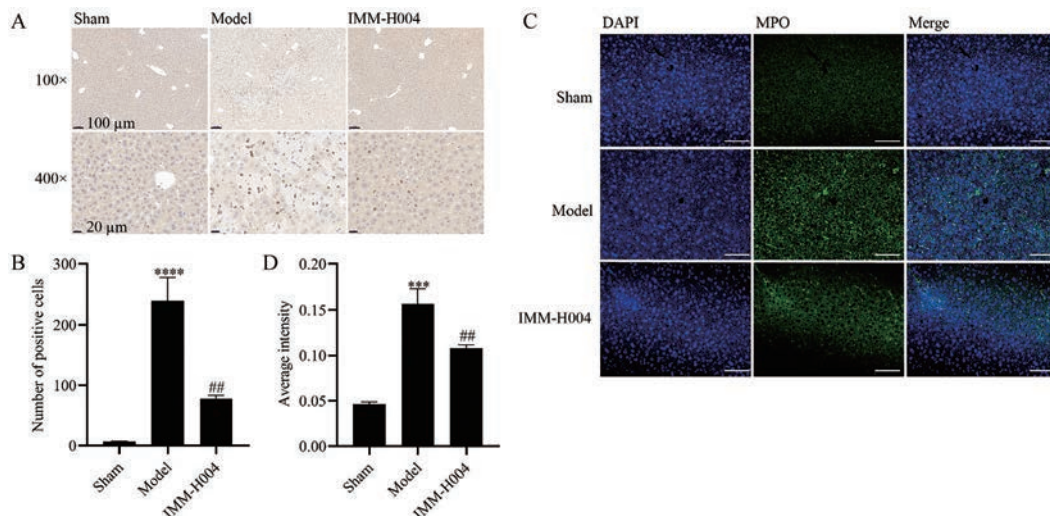
## 讨论

HIRI 是指肝组织发生一段时间的缺血后恢复血液灌注, 组织损伤没有减轻反而加重的一种病理过程, 是肝脏切除和肝移植等手术过程中不可避免的并发症, 直接影响到疾病的预后、手术的成功率以及患者存活率。有许多研究显示, CC 类和 CXC 类趋化因子参与了 HIRI 的进程<sup>[9-11]</sup>, 抑制或者敲除趋化因子及其受体可减轻 HIRI, 因此靶向趋化因子及其受体有可能成为 HIRI 治疗的一个新方向。CKLF1 是一种 CC 类的趋化因子, 本课题组的前期研究发现, CKLF1 可通过抑制 MAPK 通路的激活, 抑制炎症因子的释放以及中性粒细胞的聚集, 从而减轻 HIRI<sup>[4]</sup>。IMM-H004 是以 CKLF1 为靶点, 经过筛选和结构优化得到的 CKLF1 的竞争性拮抗剂, IMM-H004 能否对 HIRI 发挥保护作用成为作者关注的问题。

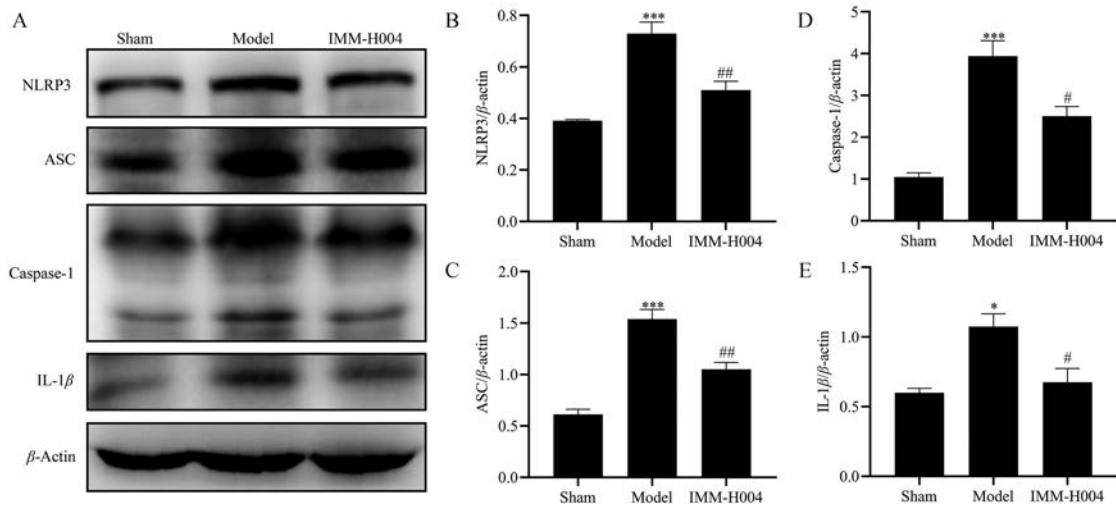
本实验采用小鼠肝脏缺血再灌注损伤模型评价 IMM-H004 对 HIRI 保护作用。结果表明, IMM-H004



**Figure 3** The effect of IMM-H004 on inflammatory factors after HIRI. The mRNA expression of TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), and IL-6 (C) in ischemia liver tissue.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs sham group; # $P < 0.05$ , #### $P < 0.0001$  vs model group



**Figure 4** The effect of IMM-H004 on neutrophil infiltration after HIRI. A: Representative images of myeloperoxidase (MPO) immunohistochemistry staining; B: Quantitative analysis of positive cells in immunohistochemistry staining; C: Representative images of MPO immunofluorescence staining; D: Quantitative analysis of average intensity in immunofluorescence staining.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs sham group; ## $P < 0.01$  vs model group. DAPI: Diamidino-phenyl-indole



**Figure 5** The effect of IMM-H004 on NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome activation after HIRI. A: Representative blots of proteins in NLRP3 inflammasome; B-E: Quantitative analysis of NLRP3 (B), apoptosis-associated speck-like protein (ASC, C), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (caspase-1, D) and IL-1 $\beta$  (E) normalized to  $\beta$ -actin.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs sham group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs model group

对小鼠 HIRI 有显著的保护作用, 可以显著降低小鼠血清中肝脏生化指标 ALT、AST 和 LDH 的含量, 肝组织病理结果也显示 IMM-H004 给药可显著降低肝脏损伤程度, 肝脏坏死的程度较模型组明显降低。炎症反应在 HIRI 中有着至关重要的作用, 在 HIRI 的进程中受损的肝细胞和 Kuffer 细胞会释放出促炎因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等进一步加剧损伤<sup>[12]</sup>。本研究发现, 模型组小鼠肝组织的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 水平显著升高, 而 IMM-H004 可显著降低这些促炎因子的 mRNA 含量, 提示 IMM-H004 有可能是通过降低 HIRI 中的炎症反应发挥对 HIRI 的保护作用。在 HIRI 的早期阶段, 受损的肝细胞和 Kuffer 细胞释放出的 ROS 和促炎因子会激活中性粒细胞。激活的中性粒细胞会进一步释放 ROS 和多种蛋白酶如组织金属蛋白酶等损伤肝细胞。此外, 中性粒细胞还会释放 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  等促炎因子进一步加剧炎症反应, 抑制中性粒细胞的聚集和激活可显著缓解 HIRI<sup>[13]</sup>。本研究利用免疫组化染色检测各组小鼠肝组织内 MPO 的表达, 结果显示 IMM-H004 给药组肝组织内 MPO 阳性细胞数显著减少, 提示 IMM-H004 可显著降低 HIRI 过程中肝组织内的中性粒细胞聚集。免疫荧光染色的结果与免疫组化一致, IMM-H004 给药组肝组织切片荧光染色的平均光密度值较模型组显著降低, 因此可以得出结论, IMM-H004 给药可抑制 HIRI 过程中的中性粒细胞的浸润。

越来越多的研究表明, NLRP3 炎症小体通路在 HIRI 中有着至关重要的作用<sup>[14,15]</sup>。NLRP3 炎性小体由

NLRP3、接头蛋白 ASC 以及效应蛋白 caspase-1 三部分组成。当 NLRP3 被激活时, NLRP3 与接头蛋白 ASC 结合, 引发 caspase-1 的活化, caspase-1 切割 IL-1 $\beta$  前体, 促进 IL-1 $\beta$  的成熟和分泌以及细胞焦亡<sup>[16,17]</sup>。因此, 利用 Western blot 检测了 HIRI 过程中 NLRP3 炎症小体通路蛋白的表达变化。结果显示, 模型组 NLRP3、ASC、caspase-1 和 IL-1 $\beta$  的蛋白表达显著高于假手术组, 并且有统计学差异。IMM-H004 给药可显著降低 NLRP3、ASC、caspase-1 和 IL-1 $\beta$  的蛋白表达, 与模型组比较具有统计学差异。因此, 作者推测 IMM-H004 可能是通过降低 HIRI 过程中 NLRP3 炎症小体通路的激活, 发挥对 HIRI 的保护作用。

综上所述, 作者利用小鼠 HIRI 模型评价了化合物 IMM-H004 对 HIRI 的保护作用, 结果显示 IMM-H004 对小鼠 HIRI 具有显著的保护作用, 同时还可以降低 HIRI 中的炎症反应, 抑制中性粒细胞的聚集以及抑制 NLRP3 炎症小体通路的激活。此外, 作者推测 IMM-H004 是通过竞争性拮抗 CKLF1 与趋化因子受体 4 (C-C motif chemokine receptor 4, CCR4) 的结合来抑制 CKLF1 从而发挥保护作用的, 在本课题组的前期研究中已利用 Co-IP<sup>[5]</sup> 和 BiFC 双分子荧光互补技术<sup>[18]</sup> 证实 IMM-H004 可拮抗 CKLF1 与 CCR4 的结合, 因此本研究并没有验证 CKLF1 的变化及其与 CCR4 结合的变化。综上, 本研究证实了 IMM-H004 对 HIRI 的保护作用, IMM-H004 为治疗缓解 HIRI 提供了一种新的方案。

**作者贡献:** 李芳芳负责实验方案设计、论文撰写; 李芳芳、周欣进行具体实验; 周欣、闫旭参与论文修改; 楚世峰、陈

乃宏进行实验评估和指导。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Wang YC, Yang Y, Wang M, et al. Eosinophils attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury in mice through ST2-dependent IL-13 production [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13: eabb6576.
- [2] Nakazato PCG, Victorino JP, Fina CF, et al. Liver ischemia and reperfusion injury. Pathophysiology and new horizons in preconditioning and therapy [J]. *Acta Cir Bras*, 2018, 33: 723-735.
- [3] Xu DW, Chen LL, Chen XS, et al. The triterpenoid CDDO-imidazole ameliorates mouse liver ischemia-reperfusion injury through activating the Nrf2/HO-1 pathway enhanced autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e2983.
- [4] Li FF, Zhou X, Chu SF, et al. Inhibition of CKLF1 ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury *via* MAPK pathway [J]. *Cytokine*, 2021, 141: 155429.
- [5] Ai QD, Chen C, Chu SF, et al. IMM-H004 therapy for permanent focal ischemic cerebral injury *via* CKLF1/CCR4-mediated NLRP3 inflammasome activation [J]. *Transl Res*, 2019, 212: 36-53.
- [6] Chu SF, Zhao Z, Zhang W, et al. Upregulating the expression of survivin-HBXIP complex contributes to the protective role of IMM-H004 in transient global cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54: 524-540.
- [7] Zuo W, Zhang W, Han N, et al. Compound IMM-H004, a novel coumarin derivative, protects against CA1 cell loss and spatial learning impairments resulting from transient global ischemia [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21: 280-288.
- [8] Ai QD, Chen C, Chu SF, et al. IMM-H004 protects against cerebral ischemia injury and cardiopulmonary complications *via* CKLF1 mediated inflammation pathway in adult and aged rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1661.
- [9] Lee CM, Peng HH, Yang PL, et al. C-C chemokine ligand-5 is critical for facilitating macrophage infiltration in the early phase of liver ischemia/reperfusion injury [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 3698.
- [10] Zhang JB, Xu P, Song P, et al. CCL2-CCR2 signaling promotes hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. *J Surg Res*, 2016, 202: 352-362.
- [11] de Oliveira THC, Marques PE, Poosti F, et al. Intravital microscopic evaluation of the effects of a CXCR2 antagonist in a model of liver ischemia reperfusion injury in mice [J]. *Front Immunol*, 2018, 8: 1917.
- [12] Zheng NX, Liu F, Lu H, et al. Schisantherin A protects against liver ischemia-reperfusion injury *via* inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 47: 28-37.
- [13] Jin H, Zhang CP, Sun CY, et al. OX40 expression in neutrophils promotes hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. *JCI Insight*, 2019, 4: e129736.
- [14] Xu Y, Yao J, Zou C, et al. Asiatic acid protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inactivation of Kupffer cells *via* PPAR $\gamma$ /NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 86339-86355.
- [15] Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12: 387-400.
- [16] Xu Y, Tang YB, Lu JW, et al. PINK1-mediated mitophagy protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by restraining NLRP3 inflammasome activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 871-886.
- [17] Liu W, Guo WJ, Xu Q, et al. Advances in mechanisms for NLRP3 inflammasomes regulation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1505-1512.
- [18] Peng Y, Zhang Z, Chu SF, et al. Validation of effect of IMM-H004 on CKLF1/CCR4 combination based on BiFC [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2020, 36: 1030-1035.