

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00076

· 研究快报 ·

巨噬细胞游走抑制因子在复杂区域疼痛综合征 1 型胫骨骨折大鼠模型中的表达及作用

吴 锐, 李荣亨*

重庆医科大学附属第一医院中西医结合科, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨巨噬细胞游走抑制因子(MIF)在复杂区域疼痛综合征 1 型(CRPS1)的表达及 MIF 靶向阻断对 CRPS1 大鼠疼痛行为的影响。**方法** 健康成年雄性 SD 大鼠 50 只, 随机分为正常组、假手术组、模型组、治疗对照组及 MIF 抑制剂(ISO-1)治疗组。后 3 组均进行 CRPS1 远端胫骨骨折造模; ISO-1 治疗组在骨折 2 周后开始将 ISO-1 溶解于 10 μ l 5% DMSO 后行皮下注射, 1 mg/(kg·d), 连续 14 d; 治疗对照组同期皮下注射 10 μ l 5% DMSO 作为对照。测定各组大鼠治疗前后下肢肿胀程度及痛觉阈值并比较; 采用 ELISA、蛋白质印迹法测定各组大鼠血清、脑脊液、皮肤、坐骨神经和脊髓中 MIF 蛋白的表达并比较。**结果** 模型组大鼠后足明显肿胀, 疼痛阈值明显下降, 与基线值及对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。MIF 抑制剂 ISO-1 治疗组的下肢肿胀及痛觉阈值均有改善, 与模型组相比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组、治疗对照组及 MIF 抑制剂(ISO-1)治疗组的 MIF 在血清、脑脊液、皮肤、坐骨神经和脊髓的表达均高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** MIF 是 CRPS1 的关键性炎症因子, 抗 MIF 可能成为其新的靶向治疗手段。

[关键词] 复合性局部疼痛综合征; 巨噬细胞游走抑制因子; 水肿; 疼痛

[中图分类号] R 683.423 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0076-05

Expression and function of macrophage migration inhibitory factor in a rat tibia fracture model of complex regional pain syndrome type I

WU Rui, LI Rong-heng*

Department of Chinese and Western Integrative Medicine, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in complex regional pain syndrome I (CRPS I) rat model and the possible efficacy of MIF blockage in treatment of CRPS I. **Methods** Fifty healthy male SD rats were randomly divided into the following 5 groups: control, sham, model, DMSO control, and ISO-1 (inhibitor of MIF) treatment. CRPS1 models were created in the last 3 groups; rats in the ISO-1 treatment group were subcutaneously treated with ISO-1 dissolved in 10 μ l 5% DMSO at 1 mg/(kg·d) for 14 d. DMSO control group was only given 10 μ l 5% DMSO. The pain threshold and thickness of the hindpaws were measured before and after treatment and were compared. The levels of MIF protein were examined in the serum, skin, spinal cord, sciatic nerve, and cerebrospinal fluid using ELISA and Western blotting analysis. **Results** Rats in the model group had noticeable hindpaw edema and significantly decreased pain threshold compared with the baseline and that of the control group ($P < 0.01$). The hindpaw edema and pain threshold were significantly improved in ISO-1 treatment group compared with those in the model group ($P < 0.05$). MIF levels in the serum, skin, spinal cord, cerebrospinal fluid and sciatic nerve were higher in the model, DMSO control, and ISO-1 groups compared with those in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** MIF is a key inflammatory factor of CRPS I, and anti-MIF treatment might be a new therapy for human CRPS I.

[Key words] complex regional pain syndromes; macrophage migration-inhibitory factors; edema; pain

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1):76-80]

复杂区域疼痛综合征 1 型(CRPS1)是以局部肢体疼痛异常为主要表现, 涉及皮肤、血管、神经、肌肉

和骨关节的致残性疾病, 在骨折或卒中后发病率高, 达 35%~64%^[1]。迄今其病理机制仍不明确, 因缺

[收稿日期] 2011-09-29

[接受日期] 2011-12-20

[作者简介] 吴 锐, 博士生, 副主任医师. E-mail: temclinic@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89012791, E-mail: lilywr2010@gmail.com

乏有效治疗手段,多数患者长期忍受慢性疼痛并最终丧失劳动力。自1942年Sudeck首次提出肢体局部炎症反应可能是CRPS1的主要发病原因之后,越来越多的证据说明CRPS1的发生和维持与免疫炎症关系密切^[2-3]。但对于CRPS1的炎症是局部、还是全身性反应至今仍存在质疑,已找到的炎症因子临床意义亦不明确^[4]。因此寻找到具有诊治意义的CRPS1关键性炎症因子是当前CRPS1治疗的突破点。

巨噬细胞游走抑制因子(MIF)是炎症反应不可缺少的前炎症促炎因子,目前已被作为多种疾病炎症活动的生物标志物及治疗靶点而备受关注^[5]。最近研究发现MIF在炎性痛、神经病理性疼痛中也起着重要的病理生理作用^[6]。为探讨MIF是否参与并促进CRPS1的炎症反应及病理痛,本研究采用胫骨骨折加制动的CRPS1大鼠模型,运用ELISA、蛋白质印迹分析方法检测MIF在CRPS1大鼠血清、脑脊液、皮肤、坐骨神经及脊髓中的表达变化,并探讨抗MIF靶向治疗对CRPS1大鼠疼痛行为的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级健康成年雄性SD大鼠50只,由南昌大学医学院实验动物科学部提供(动物许可证号:江西医动证字第02196-02),体质量250g左右。大鼠实验操作按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。

1.2 实验材料 氯胺酮针剂(规格:0.1g,0.2ml);MIF抑制剂ISO-1[(S,R)-3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid, methyl ester],Calbiochem];大鼠MIF ELISA检测试剂盒(Uscn Life Science Inc.);大鼠抗MIF多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);von-Frey机械痛刺激器;电子游标卡尺等。

1.3 造模方法^[7] 在氯胺酮麻醉下,将成年大鼠右后肢体用2.5cm宽的弹力绷带裹紧。采用手术钳造成胫骨末端骨折。将骨折后肢用石膏固定使大鼠臀部、膝盖和足踝在正常站立时保持屈曲状态。石膏的范围从后足的跖骨到腹部成“人”字形。为了防止大鼠啃咬身体上的石膏,所用石膏材料表面采用镀锌网包裹。石膏固定后及时皮下注射5ml生理盐水以防止术后脱水。术后4周,麻醉下用石膏剪去除大鼠身上石膏。此时,所有实验中应用的大鼠

骨折处均已融合。观察到大鼠足部皮肤充血、肿胀并出现自发痛和机械触诱发痛等异常时,认为造模成功。

1.4 动物分组 50只大鼠随机分为5组,每组10只,分别为正常组、假手术组、模型组、治疗对照组及ISO-1治疗组。空白对照不予任何处理,假手术组给予石膏假固定,但无胫骨骨折。另外3组大鼠均进行CRPS1远端胫骨骨折造模。ISO-1治疗组在骨折2周后开始将ISO-1(1mg/kg)^[8]溶解于10 μ l 5% DMSO后行皮下注射,每日1次,连续14d,直至石膏拆除;治疗对照组同期皮下注射10 μ l 5% DMSO作为对照。

1.5 肿胀程度和疼痛行为测定 造模前测定各组大鼠的后足厚度、疼痛行为作为基线值。术后4周后拆除石膏并检测后足厚度、疼痛行为。疼痛行为测定方法参见文献^[9]。自发痛测定:大鼠置于用有机玻璃特制的透明观测室内适应20min后,用摄像机记录30min,统计后肢自发抬腿的次数和持续时间。实验侧自发抬腿的次数和持续时间较对照侧显著上升为自发痛指征。机械触诱发痛测定:采用von-Frey纤维丝依次刺激右后足底中部皮肤,刺激过程中产生明显的缩爪或舔足,即为阳性反应。每只大鼠均从小剂量的针丝开始刺激,每次加压时间6s,尼龙丝弯曲弧度相同,以确保每次施加的刺激相同。每次重复间隔10s左右。记录6次阳性反应的纤维强度,应用Dixon^[10]报道的方法计算50%疼痛阈值,公式为 $10^{\lg(x)+k\delta}$,其中 x 为最后刺激的强度; k 为不同刺激方式的系数; δ 为各刺激强度相邻间距的均数。

1.6 ELISA法检测血清、脑脊液、皮肤、坐骨神经及脊髓中MIF的含量 拆除石膏24h后取尾血2ml静置2h后离心取血清,取脑脊液1ml,均-70℃冻存。取大鼠右后足足背皮肤及坐骨神经、L4~5段脊髓,称重后置于干冰中的T-per组织蛋白提取试剂(加入aprotinin,leupeptin,pepstatin,PMSF)中并将其切割成碎片。随后匀浆,离心(20min,14000 \times g,4℃)取上清液到微量离心管并再加Triton X-100至浓度为0.01%,再次离心后取上清液于-70℃冻存。所有标本集中采用ELISA法检测MIF蛋白含量(最低检测浓度3 μ g/L),操作按试剂盒说明书进行。最后用酶标仪读取450nm波长处各样本的光密度(D)值。样品的MIF含量根据D值由标准曲线换算出相应的质量浓度,并乘以

匀浆时稀释的倍数。

1.7 蛋白质印迹法检测皮肤、坐骨神经及脊髓的 MIF 蛋白表达含量 取足背皮肤、坐骨神经及 L4~5 脊髓至于干冰中的 PBS 混合液中切割、匀浆、离心(方法同 ELISA)。取上清匀浆液裂解 30 min。按匀浆液 50 μg/道进行 SDS-PAGE,将蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶转移至硝酸纤维素膜上,0.1%TBS 洗膜 5 min,3 次;5%脱脂奶粉于室温下封闭 2 h,取膜,加入 MIF 抗体(1:2 000)或 β-actin(1:2 000),4℃过夜。冲洗后滴加辣根过氧化物酶标记的二抗工作液(羊抗兔 IgG,1:500),37℃孵育 1 h,0.1% TBS 冲洗 3 次,充分显色后用清水终止反应。暗室中进行化学发光法显影,高敏感胶片摄片。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较及多重比较。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠后足厚度及疼痛行为的变化 造模前测定各组大鼠的后足厚度、疼痛行为作为基线值。假手术组拆除石膏后后足厚度及疼痛行为与空白对照及基线值比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组后足明显肿胀,疼痛阈值明显下降,与基线值及对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。注射 ISO-1 大鼠的后足厚度[(5.8±0.7) mm]与模型组[(7.6±0.9) mm]及注射 DMSO 组[(6.7±1.2) mm]

比较明显改善,差异有统计学意义($P < 0.05$)。注射 ISO-1 大鼠的疼痛阈值也明显改善,与模型组及注射 DMSO 组大鼠比较差异有统计学意义($P < 0.05$),但仍低于正常对照组及基线值($P < 0.05$)。见图 1。

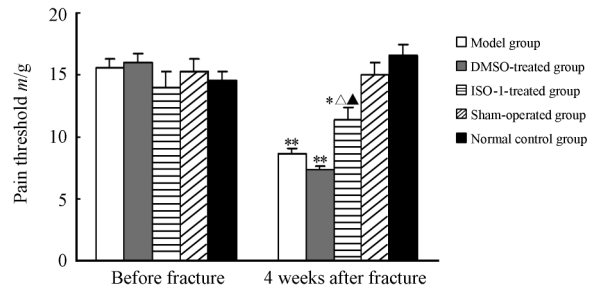


图 1 各组大鼠疼痛阈值的变化

Fig 1 Changes of pain thresholds in different groups

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control group and before fracture; △ $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs DMSO-treated group; $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

2.2 MIF 在 CRPS1 大鼠不同部位的表达 ELISA 法检测结果显示,模型组大鼠 MIF 在血清、脑脊液、皮肤、坐骨神经及脊髓中的含量与正常对照组及假手术组比较均增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);ISO-1 治疗未对 MIF 在 CRPS1 大鼠各部位表达造成影响,与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。蛋白质印迹检测显示模型组皮肤、坐骨神经及脊髓中的 MIF 均强表达,而正常对照组及假手术组皮肤、坐骨神经及脊髓中 MIF 表达处于低水平,两者比较差异有统计学意义($P < 0.01$,图 2)。

表 1 ELISA 检测 MIF 在各组大鼠血清、脑脊液、皮肤、坐骨神经及脊髓的表达

Tab 1 Expression of MIF in serum, cerebrospinal fluid, skin, sciatic nerve, spinal cord, and cerebrospinal fluid as detected by ELISA

$n = 10$, $\bar{x} \pm s$, $\rho_B / (ng \cdot L^{-1})$

Group	Serum	CSF	Skin	Sciatic nerve	Spinal cord
Normal control	33.9±11.2	33.8±17.5	38.1±15.2	35.2±21.1	37.8±16.3
Sham-operated	34.4±8.5	31.5±10.6	36.8±9.1	34.7±11.1	38.2±7.5
Model	40.1±17.5*	42.3±15.6*	50.8±13.5**	64.3±21.9**	49.8±16.4**
ISO-1-treated	42.7±18.2*	43.1±12.9*	48.5±11.7**	60.3±17.1**	45.3±11.6**
DMSO-treated	40.5±15.5*	39.5±10.1*	47.8±8.1**	62.5±10.5**	46.8±13.3**

MIF: Macrophage migration inhibitory factor; CSF: Cerebrospinal fluid. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control group and sham-operated group

3 讨论

CRPS 根据有无明确神经损伤分成 I 型和 II 型两类。CRPS1 没有明确对应的神经损伤证据,临床症状

比 II 型更为复杂,发病机制至今不明^[11]。在过去的几十年里 CRPS1 一直被认为是神经病理性改变,研究也主要集中于与疼痛有关的中枢及外周神经系统方面。而随着免疫学的发展,许多炎性因子被证实在

CRPS1 局部皮肤表达上调, 如 TNF- α 、IL-6、NO 等^[2]。但由于循环的 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎性因子在

CRPS1 患者中并未见升高^[12], 因此 CRPS1 是否存在全身性炎症反应尚有争议^[3]。

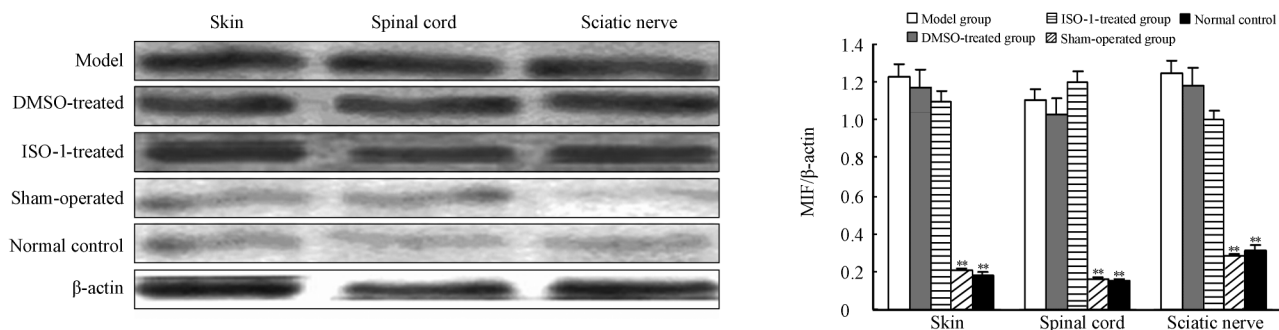


图 2 蛋白质免疫印迹法检测 MIF 在各组大鼠皮肤、脊髓及坐骨神经的表达

Fig 2 Expression of MIF in skin, spinal cord, and sciatic nerve as detected by Western blotting analysis

MIF: Macrophage migration inhibitory factor. ** $P < 0.01$ vs model group; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

MIF 是重要的促炎因子, 于 1966 年被发现并因可抑制巨噬细胞/单核细胞移动而命名。其不仅能抑制巨噬细胞游走并增强巨噬细胞的细胞内杀伤及吞噬功能促进炎症反应, 同时还可通过旁分泌及自分泌作用激活 EPK1/2-MAPK 通道, 促进促炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、NO、PGE₂、COX₂ 等的合成及释放, 使炎症反应放大^[13-15]。而 TNF- α 、IL-1 β 、NO、PGE₂、COX₂ 等作为重要的致痛性炎症因子及介质在 CRPS1 中的病理作用也已证实^[2-3, 12]。本次实验结果显示 MIF 不仅在 CRPS1 大鼠局部(皮肤、脊髓及坐骨神经)表达上调, 其血清水平也显著升高, 说明 CRPS1 大鼠的炎症反应不仅仅存在于局部, 血清 MIF 的显著升高提示 CRPS1 存在全身性炎症反应。

CRPS 发病原因并不明确, 但其起始事件多存在组织损伤或血管事件, 因此微循环障碍及缺氧被认为是 CRPS 发病及激发炎症反应的重要因素^[15]。以往认为 MIF 的表达主要在免疫细胞, 但目前发现神经元及神经胶质细胞、血管、内分泌腺体都可表达 MIF^[5, 16-17]。除炎症刺激外, 缺氧同样可以有效刺激血管内皮细胞及血管平滑肌细胞合成并释放 MIF^[5]。同时 CRPS 的外伤应激、疼痛焦虑亦可刺激下丘脑释放 MIF。MIF 与其他炎症因子不同, 它可提前贮存在细胞内池中, 并不需要在分泌前重新合成蛋白^[18], 这使得 MIF 可以比其他炎症因子更快释放, 及时参与炎症反应。因此 MIF 可能是 CRPS1 的炎症反应中最早出现并调控其他炎症因子生成, 在 CRPS 病理机制中起着关键性作用的炎症因子。

MIF 具有催化苯丙酮酸、D, L-多巴色素的异构

化反应及硫醇蛋白的氧化还原反应等酶活性。1998 年证实 MIF 的活性与其催化基因相关^[19]。随后 MIF 酶特性与其功能的相关性被进一步证实^[20]。这些数据促使了基于 MIF 的这种独特的结构及酶活性来设计小分子的 MIF 抑制剂的药物研究。化合物 *S, R*-3-4-羟苯-4, 5-二氢-5-异 唑乙酸甲酯又称 ISO-1, 能抑制 MIF 互变异构酶活性。研究显示 ISO-1 可阻抑 MIF 的生物作用, 抑制巨噬细胞内 MIF 介导的花生四烯酸上调, 还可抑制 MIF 诱导 COX-2 的生成, 抑制 LPS 诱导的 TNF 释放及 NF- κ B 在巨噬细胞转位至核内, 从而达到抗炎作用^[21-22]。ISO-1 已被证实对小鼠的自身免疫性胰腺炎、败血症、格林巴利以及炎性痛有效, 且未发现明显毒副作用^[23-26]。本实验发现, 使用 ISO-1 后 CRPS1 大鼠后足肿胀及疼痛明显减轻, 说明 MIF 参与了 CRPS1 的炎症反应及病理痛, 靶向阻断 MIF 可能是 CRPS1 治疗的突破口。

综上, 本实验结果显示 MIF 在 CRPS1 大鼠血清、脑脊液、皮肤、坐骨神经及脊髓表达均有上调, 说明 MIF 广泛参与了 CRPS1 的炎症反应及病理改变; 同时还发现 MIF 的靶向抑制剂对 CRPS1 炎症反应及病理疼痛具有治疗作用, 提示抗 MIF 有可能为 CRPS1 的治疗开辟一条新的路径。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Geurts A C, Visschers B A, Van Limbeek J, Ribbers G M. Sys-

- tematic review of acuity and treatment of post-stroke hand oedema and shoulder-hand syndrome[J]. *Scand J Rehabil Med*, 2000, 32: 4-10.
- [2] Huygen F J, De Bruijn A G, De Bruin M T, Groeneweg J G, Klein J, Zijlstra F J. Evidence for local inflammation in complex regional pain syndrome type 1[J]. *Mediators Inflamm*, 2002, 11: 47-51.
- [3] Uceyler N, Eberle T, Rolke R, Birklein F, Sommer C. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome[J]. *Pain*, 2007, 132(1-2): 195-205.
- [4] Bruehl S. An update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome[J]. *Anesthesiology*, 2010, 113: 713-725.
- [5] Baugh J A, Donnelly S C. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation[J]. *J Endocrinol*, 2003, 179: 15-23.
- [6] Wang F, Shen X, Guo X, Peng Y, Liu Y, Xu S, et al. Spinal macrophage migration inhibitory factor contributes to the pathogenesis of inflammatory hyperalgesia in rats[J]. *Pain*, 2010, 148: 275-283.
- [7] Wei T, Li W W, Guo T Z, Zhao R, Wang L, Clark D J, et al. Post-junctional facilitation of Substance P signaling in a tibia fracture rat model of complex regional pain syndrome type I [J]. *Pain*, 2009, 144: 278-286.
- [8] Cvetkovic I, Al-Abed Y, Miljkovic D, Maksimovic-Ivanic D, Roth J, Bacher M, et al. Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes [J]. *Endocrinology*, 2005, 146: 2942-2951.
- [9] Chaplan S R, Bach F W, Pogrel J W, Chung J M, Yaksh T L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53: 55-63.
- [10] Dixon W J. Efficient analysis of experimental observations[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1980, 20: 441-462.
- [11] Naleschinski D, Baron R. Complex regional pain syndrome type I : neuropathic or not[J]? *Curr Pain Headache Rep*, 2010, 14: 196-202.
- [12] Rommel O, Malin J P, Zenz M, Jänig W. Quantitative sensory testing, neurophysiological and psychological examination in patients with complex regional pain syndrome and hemisensory deficits[J]. *Pain*, 2001, 93: 279-293.
- [13] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3: 791-800.
- [14] Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21: 1267-1280.
- [15] Coderre T J, Xanthos D N, Francis L, Bennett G J. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat[J]. *Pain*, 2004, 112(1-2): 94-105.
- [16] Nishihira J, Koyama Y, Mizue Y. Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human vascular endothelial cells and its induction by lipopolysaccharide[J]. *Cytokine*, 1998, 10: 199-205.
- [17] Gilliver S C, Emmerson E, Bernhagen J, Hardman M J. MIF: a key player in cutaneous biology and wound healing [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 20: 1-6.
- [18] Carli C, Metz C N, Al-Abed Y, Naccache P H, Akoum A. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometrial cells by macrophage migration inhibitory factor: involvement of novel kinase signaling pathways[J]. *Endocrinology*, 2009, 150: 3128-3137.
- [19] Swope M, Sun H W, Blake P R, Lolis E. Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor[J]. *EMBO J*, 1998, 17: 3534-3541.
- [20] Senter P D, Al-Abed Y, Metz C N, Benigni F, Mitchell R A, Chesney J, et al. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase and biological activities by acetaminophen metabolites[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 144-149.
- [21] Mitchell R A, Metz C N, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 18100-18106.
- [22] Daun J M, Cannon J G. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000, 279: R1043-R1049.
- [23] Matsui Y, Okamoto H, Jia N, Akino M, Uede T, Kitabatake A, et al. Blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates experimental autoimmune myocarditis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 37: 557-566.
- [24] Lubetsky J B, Dios A, Han J, Aljabari B, Ruzsicska B, Mitchell R, et al. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 24976-24982.
- [25] Cvetkovic I, Al-Abed Y, Miljkovic D, Maksimovic-Ivanic D, Roth J, Bacher M, et al. Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes [J]. *Endocrinology*, 2005, 146: 2942-2951.
- [26] Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, Valster A, Messmer D, Ochani M, et al. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 36541-36544.