

Toll 样受体 4 在对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤早期中的作用

郑秀良,陈明月,乔亚琴,沈海涛,路燕

摘要 目的 利用 Toll 样受体 4 (TLR4) 抑制剂 (TAK-242) 探讨 TLR4 在对乙酰氨基酚 (APAP) 致小鼠急性肝损伤早期中的作用。方法 58 只雄性癌症研究所 (ICR) 小鼠随机划分为对照组 (正常对照组、溶剂对照组、抑制剂对照组) 和实验组 (APAP 4 h 组、APAP + TAK-242 4 h 组、APAP 12 h 组、APAP + TAK-242 12 h 组)。实验组小鼠给予单剂量腹腔注射 APAP (300 mg/kg), TAK-242 (3 mg/kg) 于 APAP 注射前 3 h 进行腹腔注射。比较各组小鼠的血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平和肝指数; HE 染色显示肝脏组织病理变化; 免疫组化法检测高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 水平; Western blot 检测 TLR4、HMGB1 和核因子- κ B (NF- κ B) 蛋白水平; 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 测定单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、白细胞介素 (IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 IL-6 基因水平; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测肝组织 IL-6 含量。结果 HE 染色显示 APAP 4 h 组小鼠肝组织出现肿大充血, 12 h 组出现典型的小叶中心性坏死, 且 APAP + TAK-242 4 h 和 12 h 组的肝脏坏死程度均较同时点 APAP 组减轻。相较于正常对照组, APAP 4 h 组的血清 ALT 水平、肝指数、TLR4、HMGB1、NF- κ B 蛋白含量和 MCP-1、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 基因水平及肝组织 IL-6 含量升高; APAP 12 h 组的血清 ALT 水平、肝指数、HMGB1 蛋白含量和肝组织 IL-6 含量升高。相较于 APAP 4 h 组, APAP + TAK-242 4 h 组的血清 ALT 水平、肝指数、TLR4、HMGB1、NF- κ B 蛋白含量和 MCP-1、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 基因水平及肝组织 IL-6 含量降低。相较于 APAP 12 h 组, APAP + TAK-242 12 h 组 TLR4、HMGB1 蛋白含量和 MCP-1、IL-1 β 、TNF- α 基因水平降低。结论 抑制 TLR4 可能通过抑制 TLR4/HMGB1 通路, 从而减轻 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤早期的炎症反应。

关键词 对乙酰氨基酚; TLR4; 肝损伤; 炎症; 小鼠; 近交 ICR
中图分类号 R 333.4; R 575

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1904-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.017

对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 作为一

种解热镇痛类药物, 自问世以来, 已在全球范围内得到广泛应用, 并因其易获取性, 往往导致有意或者无意识的超剂量服用, 导致肝脏损害, 严重者可出现急性肝衰竭^[1]。随着人们对 APAP 致肝脏损害的深入研究, 人们对其致病机制了解的越来越透彻, 包括线粒体的氧化应激、自噬、无菌性炎症等^[2-4]。在无菌性炎症的肝损伤中, 过量的 APAP 导致肝细胞广泛坏死, 引起高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1, HMGB1)、组蛋白等内源性损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 的释放, 从而活化 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 并与其结合, 激活下游的炎症信号通路, 导致炎症介质释放引起肝脏损害^[4]。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是 TLRs 家族的一员, 可识别包括病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 和 DAMPs 等在内的配体, 并活化下游信号通路激活机体自身固有免疫^[5]。HMGB1 是介导 TLR4 活化的内源性危险信号分子^[6]。TLR4 被 HMGB1 活化后可经髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖途径激活核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B), 产生白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 IL-6 等炎症细胞因子, 从而引起非酒精性脂肪肝、肝缺血-再灌注损伤等^[7-8]。但 TLR4 在 APAP 致急性肝损伤中的作用研究甚少, 因此, 该研究拟通过腹腔注射 APAP 构建急性药物性肝损伤动物模型, 并利用 TLR4 抑制剂瑞沙托维 (resatorvid, TAK-242) 初步揭示 TLR4 在 APAP 致小鼠急性肝损伤早期中的作用。为今后 TLR4 是否可以在药物性肝损伤中成为一个治疗靶点而提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 58 只 6~8 周龄 SPF 级雄性 ICR 小鼠购自浙江维通利华实验动物技术有限公司 [生产许可证编号: SCXK (浙) 2019-0001; 使用许可证

2023-06-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81800524)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院消化科, 合肥 230601

作者简介: 郑秀良, 男, 硕士研究生;

路燕, 女, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

luyancathrine@163.com

编号:SYXK(皖)2017-006]。所有小鼠于实验前1周放置于温度22~26℃、湿度40%~60%的环境中光/暗交替各12h,且可自由获取水和食物。

1.1.2 主要药物与试剂 对乙酰氨基酚(APAP)、TAK-242购自上海MedChemExpress公司;DMSO购自北京索莱宝科技有限公司;ALT检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TLR4抗体购自英国Abcam公司;NF- κ B抗体购自美国proteintech公司;HMGB1、 β -actin抗体购自美国CST公司;RT-qPCR逆转录试剂盒购自上海新贝生物科技有限公司;引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;IL-6 ELISA试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组与处理 将58只雄性ICR小鼠随机划分为7组,其中对照组(正常对照组、溶剂对照组、抑制剂对照组)每组6只,实验组(APAP 4h组、APAP+TAK-242 4h组、APAP 12h组、APAP+TAK-242 12h组)每组10只。在禁食12h后,将APAP(300 mg/kg)腹腔注入到实验组小鼠体内,TAK-242(3 mg/kg)于APAP注射前3h进行腹腔注射,其中APAP溶液用生理盐水配制,TAK-242溶液用0.5% DMSO配制。正常对照组小鼠腹腔注射与APAP组等体积生理盐水,抑制剂对照组小鼠注射与APAP+TAK-242组小鼠等体积TAK-242溶液,溶剂对照组小鼠注射与抑制剂对照组等体积的溶剂。在APAP处理后不同时间点(0、4、12h)剖杀小鼠。

1.2.2 血清ALT水平的测定 通过血清ALT水平评价小鼠肝损伤情况,根据ALT检测试剂盒说明书进行血清ALT水平的测量。

1.2.3 肝组织病理学检查 将肝脏组织用石蜡包埋后制成5 μ m厚的切片,切片于脱蜡水化后用苏木精-伊红染液着色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察,Image-Pro Plus软件对其图像进行组织病理学分析。

1.2.4 蛋白质免疫印迹 肝脏组织蛋白用RIPA裂解液提取并采用BCA法检测其浓度,经SDS-PAGE分离及PVDF膜电转移。用5%脱脂牛奶封闭后用相应的一抗孵育,并置于4℃冰箱冷藏过夜。次日,用相对应的二抗常温孵育1h,然后用化学发光显影仪曝光和拍照,利用Image J软件对图像进行分析。

1.2.5 RT-qPCR 应用TRIzol试剂对肝组织进行RNA的分离,利用FlexCycler多功能PCR仪使其逆转录成cDNA。cDNA在LightCycle-480 PCR仪上进行扩增,扩增程序为95℃、30s,95℃、10s,60℃、30s,循环45次。最后通过分析熔解曲线判断PCR扩增产物的特异性, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因相对比值。相关引物序列见表1。

表1 基因引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
IL-6	F:TTCTCTGGGAAATCGTGGAAA R:CTGCAAGAGACTTCCATCCAG
IL-1 β	F:TCCTTGTGCAAGTGTCTGAAGC R:ATGAGTGATACTGCCTGCCTGA
TNF- α	F:AGTGGTATAGACAGGTCTGTGTGG R:ACCCTCACACTCAGATCATCTTC
MCP-1	F:TGGTGGTTTGCTACGACGT R:TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA
β -actin	F:TGCTGTCCCTGTATGCCTCTGG R:ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG

1.2.6 免疫组织化学染色 肝脏组织切片脱蜡水化后进行过氧化物酶的阻断及抗原修复。然后将其与稀释后的HMGB1抗体(1:200)孵育过夜。次日,将切片与相对应的二抗进行孵育,DAB显色,苏木精染色15s,PBS返蓝、梯度乙醇脱水、二甲苯透明及中性树胶封片,显微镜下观察并拍照,利用Image-Pro Plus软件对图像进行分析。

1.2.7 酶联免疫吸附试验 ELISA法测定肝脏组织IL-6含量。样本含量的测量及计算遵循使用说明书进行。

1.3 统计学处理 SPSS 26.0软件分析数据,GraphPad Prism 8.0软件进行图片绘制。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有计量资料均满足正态分布,两组间比较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐时采用LSD法检验,方差不齐时采用Tamhane's T2法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 溶剂和抑制剂对正常小鼠肝脏的影响 溶剂对照组、抑制剂对照组及正常对照组的小鼠血清ALT水平、肝指数均未见明显差异($F = 0.758$ 、 2.211 ,均 $P > 0.05$)。见表2。溶剂对照组和抑制剂对照组与正常对照组相比,HE染色均未见明显的肝脏组织病理学变化。见图1。

2.2 抑制 TLR4 对小鼠肝脏 TLR4 的影响 与正常对照组相比,APAP 4 h 组小鼠肝脏 TLR4 的表达量上调,差异有统计学意义($t = -2.319, P < 0.05$)。而 APAP + TAK-242 4 h 及 12 h 组小鼠肝脏的 TLR4 均较同时间点 APAP 组表达量下调,差异均有统计学意义($t = 3.379, 3.724$, 均 $P < 0.01$)。见图 2。

表 2 溶剂和抑制剂对小鼠血清 ALT、肝指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	肝指数(%)
正常对照	18.462 ± 5.132	4.458 ± 0.429
溶剂对照	17.822 ± 4.837	4.752 ± 0.093
抑制剂对照	21.076 ± 4.561	4.872 ± 0.420
F 值	0.758	2.211
P 值	0.486	0.144

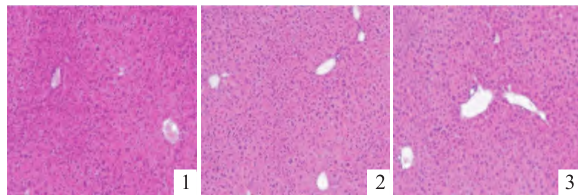


图 1 溶剂和抑制剂对小鼠肝脏组织的影响 HE × 100
1: 正常对照组; 2: 溶剂对照组; 3: 抑制剂对照组

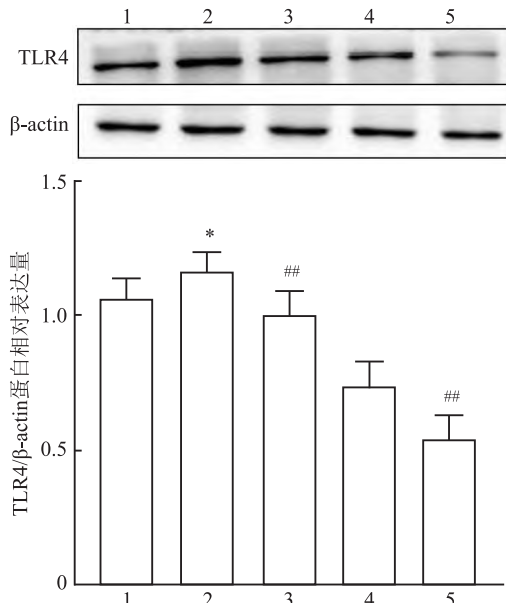


图 2 抑制 TLR4 对小鼠肝脏 TLR4 的影响

1: 正常对照组; 2: APAP 4 h 组; 3: APAP + TAK-242 4 h 组; 4: APAP 12 h 组; 5: APAP + TAK-242 12 h 组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与 APAP 组比较: ## $P < 0.01$

2.3 抑制 TLR4 对 APAP 诱导的小鼠肝损伤的影响 APAP 4 h 和 12 h 组的小鼠血清 ALT 水平及肝指数与正常对照组相比均升高,差异均有统计学意义($F = 27.674, 24.387$, 均 $P < 0.01$); 进一步分析显

示 APAP + TAK-242 4 h 组与 APAP 4 h 组相比,其血清 ALT 水平和肝指数均降低,差异均有统计学意义($t = 2.419, 5.957, P < 0.05, P < 0.01$)。HE 染色显示正常对照组小鼠肝脏组织大小形态均正常,无明显的炎症及坏死。APAP 4 h 组小鼠肝脏组织出现肿大充血,APAP 12 h 组出现典型的小叶中心性坏死。APAP + TAK-242 4 h 和 12 h 组均较同时间点 APAP 组肝脏组织坏死程度减轻。见表 3、4 和图 3。

表 3 APAP 对小鼠血清 ALT、肝指数和肝脏组织的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	肝指数(%)	肝脏坏死面积(%)
正常对照	18.462 ± 5.132	4.458 ± 0.429	0
APAP 4 h	9 138.706 ± 3 133.705 **	5.498 ± 0.291 **	4.222 ± 1.383 **
APAP 12 h	4 292.528 ± 1 929.486 **	6.266 ± 0.582 **	19.175 ± 1.400 **
F 值	27.674	24.387	393.084
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$

表 4 抑制 TLR4 对 APAP 肝损伤小鼠血清 ALT、肝指数和肝脏组织的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	4 h	12 h
ALT(U/L)		
APAP 组	9 138.706 ± 3 133.705	4 292.528 ± 1 929.486
APAP + TAK-242 组	5 364.688 ± 2 187.669#	4 264.241 ± 1 191.947
t 值	2.419	0.031
P 值	0.036	0.976
肝指数(%)		
APAP 组	5.498 ± 0.291	6.266 ± 0.582
APAP + TAK-242 组	4.656 ± 0.187##	5.734 ± 0.153
t 值	5.957	2.169
P 值	< 0.01	0.076
肝脏坏死面积(%)		
APAP 组	4.222 ± 1.383	19.175 ± 1.400
APAP + TAK-242 组	1.335 ± 0.368##	8.650 ± 1.541##
t 值	4.511	11.302
P 值	< 0.01	< 0.01

与 APAP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

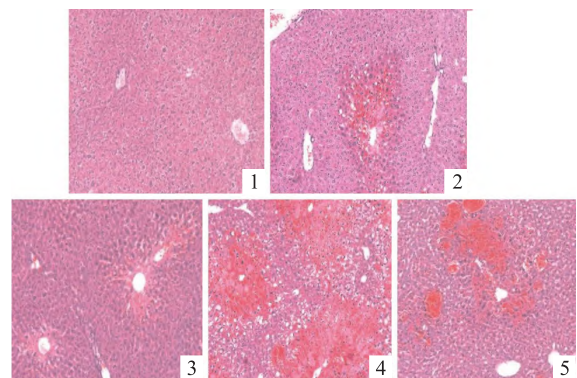


图 3 抑制 TLR4 对 APAP 诱导的小鼠肝脏组织的影响 HE × 100
1: 正常对照组; 2: APAP 4 h 组; 3: APAP + TAK-242 4 h 组; 4: APAP 12 h 组; 5: APAP + TAK-242 12 h 组

2.4 抑制 TLR4 对肝脏 HMGB1 和 NF- κ B 蛋白表达的影响 肝脏 IHC 结果显示 APAP 4 h 和 12 h 组的 HMGB1 蛋白含量均高于正常对照组, 差异均有统计学意义 ($F = 83.945, P < 0.01$); 而 APAP + TAK-242 4 h 和 12 h 组的 HMGB1 的蛋白含量均较同时点 APAP 组降低, 差异均有统计学意义 ($t = 3.561, 5.022, 均 P < 0.01$)。见图 4A、B。Western blot 分析显示, APAP 4 h 组 HMGB1、NF- κ B 的蛋白含量高于正常对照组, 两组间差异有统计学意义 ($t = -2.445, -2.994, 均 P < 0.05$); 相较于 APAP 4 h 组, APAP + TAK-242 4 h 组的 HMGB1、NF- κ B 的蛋白含量在肝脏中的表达均降低, 差异均有统计学意义 ($t = 3.113, 4.506, 均 P < 0.05$); APAP + TAK-242 12 h 组的 HMGB1 的蛋白含量较同时点 APAP 组降低, 差异有统计学意义 ($t = 3.462, P < 0.01$)。见图 4C - E。

2.5 抑制 TLR4 影响炎症因子 MCP-1、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 在肝脏中的表达 各组小鼠肝脏 MCP-1、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 基因水平用 RT-qPCR 检测, ELISA 法检测各组小鼠肝组织 IL-6 含量。结果显示, 与正常对照组相比, APAP 4 h 组的肝脏 MCP-1、

IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 基因水平及肝组织 IL-6 的含量均升高, 差异均有统计学意义 ($t = -3.935, -8.931, -2.300, -7.307, -6.026, P < 0.05, P < 0.01$); 见图 5A - E。APAP 12 h 组的肝组织 IL-6 含量升高, 差异有统计学意义 ($t = -6.168, P < 0.01$)。见图 5E。与 APAP 4 h 组相比, APAP + TAK-242 4 h 组的 MCP-1、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 基因水平及组织 IL-6 的含量在肝脏中的表达均降低, 差异均有统计学意义 ($t = 4.855, 11.196, 3.071, 8.364, 2.277, P < 0.05, P < 0.01$); 见图 5A - E。APAP + TAK-242 12 h 组与 APAP 12 h 组相比, 其 MCP-1、IL-1 β 和 TNF- α 的基因水平在肝脏中的表达均降低, 差异均有统计学意义 ($t = 8.941, 3.194, 3.751, P < 0.05, P < 0.01$)。见图 5A - C。

3 讨论

药物性肝损伤是由药物本身或其代谢产物所致的肝脏损害。目前许多国内外学者对一些常引起肝损伤的药物做了大量研究, 其中以 APAP 致肝脏损害的机制研究最为深入。目前研究^[5,9]表明, 服用过量的 APAP 可形成 APAP 蛋白加合物, 引起氧化

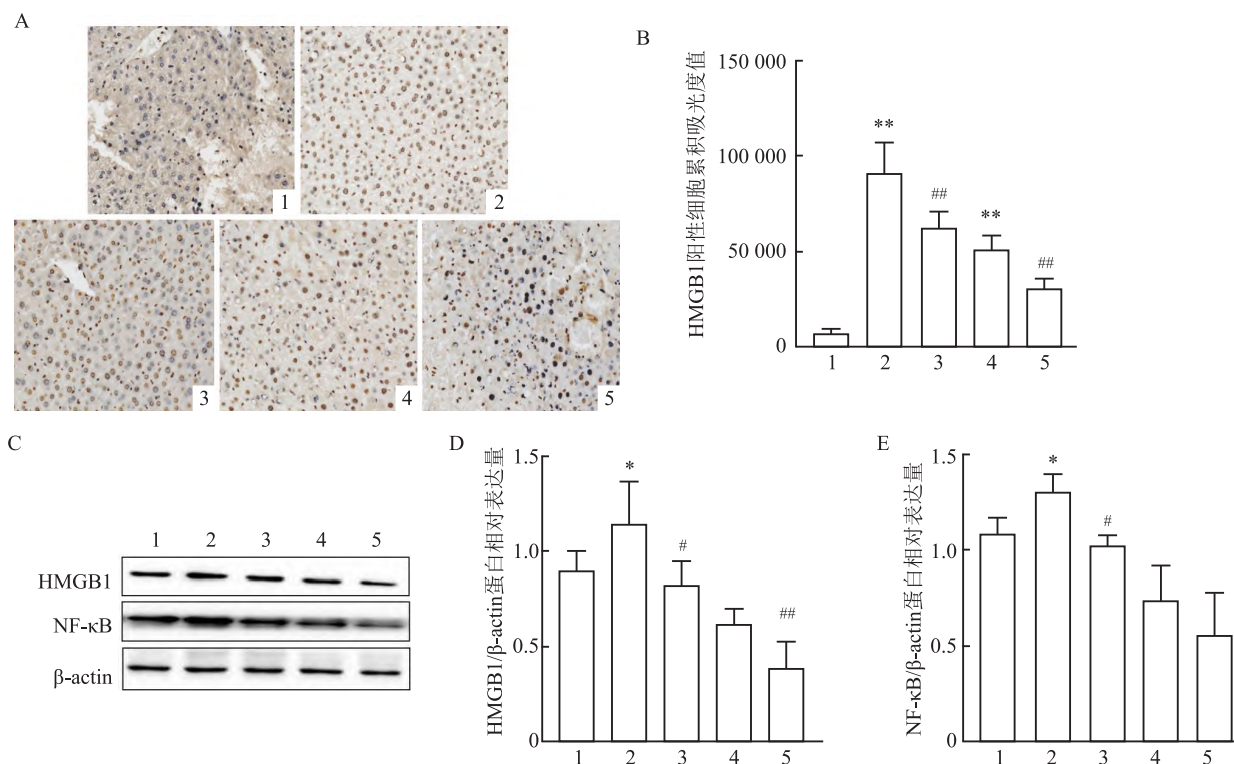


图4 抑制 TLR4 对肝脏 HMGB1 和 NF- κ B 蛋白表达的影响

A: HMGB1 免疫组织化学染色 $\times 200$; B: HMGB1 阳性细胞累积吸光度值; C-E: HMGB1、NF- κ B 蛋白含量在肝脏组织中的表达; 1: 正常对照组; 2: APAP 4 h 组; 3: APAP + TAK-242 4 h 组; 4: APAP 12 h 组; 5: APAP + TAK-242 12 h 组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 APAP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

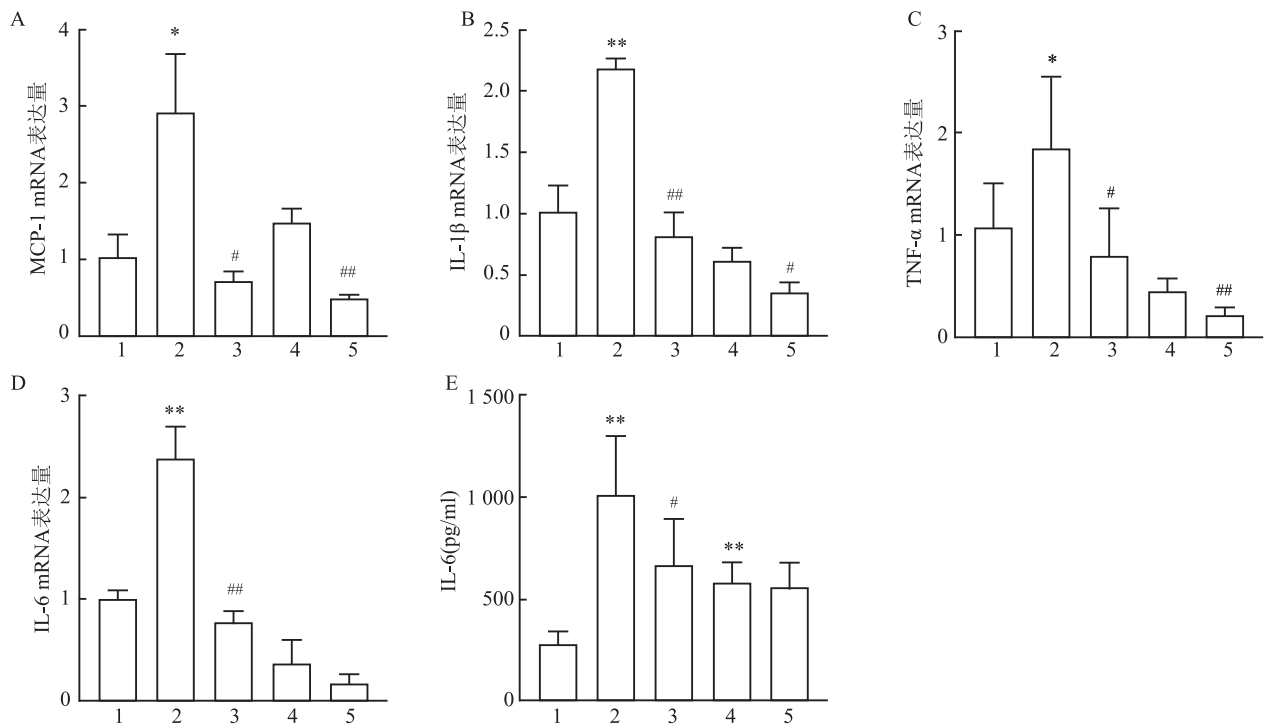


图5 抑制 TLR4 下调炎症因子 MCP-1、IL-1β、TNF-α、IL-6 在肝脏中的表达

A-D: MCP-1、IL-1β、TNF-α、IL-6 基因水平; E: 肝组织 IL-6 含量; 1: 正常对照组; 2: APAP 4 h 组; 3: APAP + TAK-242 4 h 组; 4: APAP 12 h 组; 5: APAP + TAK-242 12 h 组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 APAP 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

应激、MPTP 开放,从而导致肝细胞坏死。坏死的肝细胞释放 DAMPs,并与 TLR4 结合,从而活化下游的炎症信号通路,激活 NF-κB,导致炎性细胞分泌 TNF-α、IL-6 等炎症介质加重肝损伤。

该研究通过腹腔注射 APAP 成功建立小鼠急性肝损伤模型,肝脏受损导致内源性配体 DAMPs 的释放,并与 TLR4 结合,激活下游的炎症信号通路,导致炎性介质的释放,从而引起急性肝损伤。研究表明 ICR 小鼠经腹腔注射 APAP 后其血清 ALT 水平、肝指数升高,肝组织病理学显示肝小叶中心性坏死。而抑制 TLR4 可在小鼠肝损伤早期降低血清 ALT 水平和肝指数,减轻肝组织病理损伤。

APAP 诱导肝组织损伤后,坏死的肝细胞释放内源性配体 DAMPs,DAMPs 结合 TLRs 激活先天免疫系统,导致炎症因子释放,引起肝损伤^[9]。有研究^[10]表明抑制 TLR4 可通过对 TLR4/NF-κB、TLR4/HMGB1 等信号通路的抑制来降低炎症反应从而对肝脏具有保护作用;敲除 TLR4 则可通过对 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路的抑制,来减少炎症反应,达到减轻肝损伤的目的^[11]。在该研究中,经 TAK-242 处理后的小鼠肝组织中的 TLR4、HMGB1、NF-κB 的蛋白含量均降低。这些结果表明 TLR4 的抑制可减轻 APAP 所致的急性肝损伤,其机制可能在

于抑制了 TLR4/HMGB1 信号通路的活化。

部分研究^[12-14]表明 TLR4 通路的激活可引起肌肉、骨关节、血管平滑肌等组织产生炎症细胞,引起 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 等炎症因子的释放,从而对组织造成损伤;而抑制或敲除 TLR4 则能使组织减少上述炎症因子的释放,减轻损伤。在该研究中,APAP 活化 TLR4 信号通路促进炎症因子 (MCP-1、IL-1β、TNF-α 和 IL-6) 在肝组织中的分泌,而抑制 TLR4 则能下调上述炎症因子水平。以上结果表明肝脏损伤的减轻可能是通过抑制 TLR4 下游的炎症信号通路来下调炎症因子,降低肝脏炎症反应。

综上所述,该研究通过对 ICR 小鼠进行体内注射 APAP 溶液来构建急性药物性肝损伤模型并利用 TLR4 抑制剂 (TAK-242) 初步揭示 TLR4 在 APAP 致小鼠急性肝损伤早期中的作用。结果显示,抑制 TLR4 能降低 APAP 致急性肝损伤早期小鼠的血清 ALT 活力和肝指数、减轻肝组织病理损伤改变。同时,抑制 TLR4 可以抑制肝脏 TLR4/HMGB1 通路的激活,使 TLR4、HMGB1 和 NF-κB 的蛋白含量降低,并下调炎症因子 (MCP-1、IL-1β、TNF-α 和 IL-6) 在肝组织中的表达,从而减轻 APAP 诱导的急性肝损伤。本研究仅初步阐明抑制 TLR4 可能通过抑制 TLR4 下游的炎症信号通路对 APAP 致小鼠急性肝

损伤早期阶段有一定的保护作用,但对其在整个肝损伤阶段是否具有持续减轻肝损伤的作用还尚未清楚,有待进一步探究。

参考文献

- [1] Jaeschke H, Adelusi O B, Akakpo J Y, et al. Recommendations for the use of the acetaminophen hepatotoxicity model for mechanistic studies and how to avoid common pitfalls[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(12):3740-55.
- [2] Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen toxicity: novel insights into mechanisms and future perspectives[J]. *Gene Expr*, 2018, 18(1):19-30.
- [3] Shan S, Shen Z, Song F. Autophagy and acetaminophen-induced hepatotoxicity[J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(7):2153-61.
- [4] Yang R, Tennesse T I. DAMPs and sterile inflammation in drug hepatotoxicity[J]. *Hepato Int*, 2019, 13(1):42-50.
- [5] Aluri J, Cooper M A, Schuettelz L G. Toll-like receptor signaling in the establishment and function of the immune system[J]. *Cells*, 2021, 10(6):1374.
- [6] Yang H, Wang H, Andersson U. Targeting inflammation driven by HMGB1[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:484.
- [7] Ye M, Tang Y, He J, et al. Alleviation of non-alcoholic fatty liver disease by Huazhi Fugan Granules is associated with suppression of TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Clin Investig Arterioscler*, 2021, 33(5):257-66.
- [8] Xie T, Li K, Gong X, et al. Paeoniflorin protects against liver ischemia/reperfusion injury in mice *via* inhibiting HMGB1-TLR4 signaling pathway[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(11):2247-55.
- [9] Yang T, Wang H, Wang X, et al. The dual role of innate immune response in acetaminophen-induced liver injury[J]. *Biology (Basel)*, 2022, 11(7):1057.
- [10] Ma X, Zhang W, Jiang Y, et al. Paeoniflorin, a natural product with multiple targets in liver diseases-a mini review [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:531.
- [11] Chen S N, Tan Y, Xiao X C, et al. Deletion of TLR4 attenuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(10):1610-9.
- [12] Dos Santos R S, Veras F P, Ferreira D W, et al. Involvement of the Hsp70/TLR4/IL-6 and TNF- α pathways in delayed-onset muscle soreness[J]. *J Neurochem*, 2020, 155(1):29-44.
- [13] Ding Y, Wang L, Zhao Q, et al. MicroRNA-93 inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2):779-90.
- [14] Qu R N, Qu W. Metformin inhibits LPS-induced inflammatory response in VSMCs by regulating TLR4 and PPAR- γ [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11):4988-95.

Role of Toll-like receptor 4 in the early stage of acetaminophen-induced acute liver injury in mice

Zheng Xiuliang, Chen Mingyue, Qiao Yaqin, Shen Haitao, Lu Yan

(*Dept of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601*)

Abstract Objective To used Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitor (TAK-242) investigate the role of TLR4 in the early stage of acetaminophen (APAP)-induced acute liver injury in mice. **Methods** Fifty-eight male institute of cancer research (ICR) mice were randomly divided into control group (normal control group, solvent control group, inhibitor control group) and experimental group (APAP 4 - hour group, APAP + TAK-242 4 - hour group, APAP 12 - hour group, APAP + TAK-242 12 - hour group). Mice in the experimental group were given a single dose of APAP (300 mg/kg) and TAK-242 (3 mg/kg) were given intraperitoneal injection 3 - hour before APAP injection. The serum alanine aminotransferase (ALT) level and liver index of mice in each group were compared; HE staining showed pathological changes of liver tissue; the level of high mobility group box-1 (HMGB1) was determined by immunohistochemistry; the levels of TLR4, HMGB1 and nuclear factor kappa B (NF- κ B) protein were detected by Western blot; the levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-6 genes were determined by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The content of IL-6 in liver tissue was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** HE staining showed liver tissue of mice obvious swelling and congestion of in APAP group at 4-hour and typical lobular central necrosis in APAP group at 12 - hour; the degree of liver necrosis in APAP + TAK-242 groups at 4 - hour and 12- hour was less than that in APAP group at the same time point. Compared with the normal control group, serum ALT level, liver index, TLR4, HMGB1, NF- κ B protein content, MCP-1, IL-1 β , TNF- α , IL-6 gene

褪黑素调控自噬抑制肝星状细胞增殖的作用及机制研究

陈涤非¹, 揭磊¹, 黄启鸣¹, 徐德祥², 任晓非¹, 洪汝涛¹

摘要 目的 研究褪黑素(MEL)对血小板源性生长因子(PDGF-BB)诱导的肝星状细胞(HSCs)增殖的影响,并探索其与自噬水平调控的相关性。方法 HSC-T6共设置5组:对照组、模型组、MEL(低、中、高)处理组。培养24 h后细胞贴壁,换用无血清的DMEM培养基,使细胞同步化于G₀期,再培养24 h后除对照组外各组加入PDGF-BB(终浓度为10 ng/ml),MEL处理组加入MEL(低剂量组为1 nmol/L,中剂量组1 μmol/L,高剂量组为0.1 mmol/L),孵育48 h。细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测MEL对PDGF-BB激活的HSCs增殖的影响。Western blot测定HSCs的微管相关蛋白1轻链3b(LC3b)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)蛋白表达水平。实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)测定HSCs LC3b mRNA、α-SMA mRNA表达水平。透射电镜观察HSCs的超微结构以了解自噬水平。结果 与对照组比较,PDGF-BB能诱导HSCs的增殖($P < 0.01$)。与模型组比较,MEL能抑制PDGF-BB激活的HSCs增殖($P < 0.01$);与对照组比较,模型组LC3b、α-SMA蛋白表达明显增强(均 $P < 0.05$),LC3b mRNA、α-SMA mRNA表达明显增强($P < 0.05$, $P < 0.01$),与模型组比较,MEL能抑制这种作用(LC3b: $P < 0.05$, $P < 0.01$; α-SMA: $P < 0.01$)。透射电镜显示,与对照组比较,模型组自噬溶酶体显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,MEL处理组自噬溶酶体显著减少($P < 0.01$)。结论 HSCs的增殖可能与自噬激活有关,MEL抑制HSCs增殖可

能与其下调自噬水平相关。

关键词 褪黑素;肝纤维化;肝星状细胞;自噬;PDGF-BB

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1910-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.018

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是各类致病因素引起肝脏损伤-修复反应的结果,其主要病理改变为肝内弥漫性细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度沉积,是多种慢性肝病向肝硬化进展的共同基础^[1]。研究^[2]表明,活化的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)在HF发展的进程中起到举足轻重的作用。研究^[3]表明,血小板源性生长因子-BB(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)是较强致炎因子之一,在HSCs激活中起重要作用。在这一过程中,溶酶体发挥积极作用^[4]。有文献^[5]提示,自噬在HF进展中发挥重要作用,但其具体机制还不清楚。HF作为肝病发展的共同通路,逆转HF是至关重要的,如果通过调节细胞自噬,减少HSCs活化,增强对肝细胞的保护和再生,就可以减缓病程甚至逆转HF。该课题组前期研究表明,在肝组织中,褪黑素(melatonin, MEL)可以抑制自噬从而减轻HF^[6]。目前自噬与HSCs增殖关系及MEL对其抑制作用除该课题组外尚未见报道,该研究将进一步研究MEL抑制HSCs增殖与抑制自噬水平的相关性。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 HSC T-6(永生系细胞,武汉普诺赛公司);DMEM高糖培养基、胎牛血清(杭州四

2023-07-04 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目(编号:202004j070-20039)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院消化内科,安徽省消化疾病重点实验室,合肥 230022

²安徽医科大学毒理系,安徽省重点实验室,合肥 230032

作者简介:陈涤非,男,硕士研究生;

洪汝涛,男,博士,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: hongrutaoah@aliyun.com

levels and IL-6 content in liver tissue of APAP 4 - hour group increased; serum ALT level, liver index, HMGB1 protein content and IL-6 content in liver tissue increased in APAP 12 - hour group. Compared with APAP 4 - hour group, serum ALT level, liver index, TLR4, HMGB1, NF-κB protein content, MCP-1, IL-1β, TNF-α, IL-6 gene level and IL-6 content in liver tissue decreased in APAP + TAK-242 4 - hour group. Compared with APAP 12 - hour group, the levels of TLR4, HMGB1 protein and MCP-1, IL-1β, TNF-α genes in APAP + TAK-242 12 - hour group decreased. **Conclusion** Inhibition of TLR4 may inhibit TLR4/HMGB1 pathway to reduce the inflammatory response in the early stage of acetaminophen-induced acute liver injury in mice.

Key words acetaminophen; TLR4; liver injury; inflammation; mice; inbred ICR