

网络出版时间:2024-10-21 11:00:21 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241018.0936.002

◇基础医学研究◇

# TLR4 调节炎症反应和自噬影响 对乙酰氨基酚肝损伤后的肝细胞再生

乔亚琴<sup>1,2</sup>, 沈海涛<sup>1</sup>, 董萍<sup>1</sup>, 路燕<sup>1</sup><sup>(1)</sup> 安徽医科大学第二附属医院消化内科, 合肥 230601;<sup>(2)</sup> 中国人民解放军空军第九八六医院消化内科, 西安 710018)

**摘要** 目的 探讨 Toll 受体 4 (TLR4) 在对乙酰氨基酚 (APAP) 诱导的人正常肝细胞 (L02) 损伤后肝细胞再生中的作用以及其可能机制。方法 体外培养 L02 细胞, 利用 CCK-8 法检测细胞活力, 筛选出 APAP 最佳作用浓度和作用时间、TLR4 抑制剂 (TAK-242) 作用浓度。Western blot 法检测核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、微管相关蛋白轻链 3 (LC3)、整合体 1 ( $\beta$ 62)、受体相互作用蛋白激酶 1 (RIP1)、受体相互作用蛋白激酶 3 (RIP3)、信号转导和转录激活因子 3 (STAT3)、磷酸化信号转导和转录激活因子 3 (p-STAT3)、增殖细胞核抗原 (PCNA)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 蛋白表达水平。qRT-PCR 法检测 TLR4、NF- $\kappa$ B、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 $\beta$ 、PCNA、Cyclin D1、细胞增殖核抗原 (Ki67) mRNA 表达水平。结果 根据 CCK-8 结果, 选择 APAP 5 mmol/L 作用 L02 细胞 24、36、48 h 模拟体外肝脏损伤及损伤后再生模型, TAK-242 100 nmol/L 于 APAP 给药前 2 h 预处理抑制 TLR4。与对照组相比, APAP 24 h 组的 NF- $\kappa$ B、RIP1、p-STAT3、PCNA、Cyclin D1 蛋白水平和 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PCNA mRNA 水平升高; APAP 36 h 组的 NF- $\kappa$ B、RIP1、RIP3、p-STAT3、PCNA、Cyclin D1 蛋白水平和 TLR4、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PCNA、Cyclin D1 mRNA 水平升高; APAP 48 h 组的 NF- $\kappa$ B、RIP1、p-STAT3、PCNA、Cyclin D1 蛋白水平和 TLR4、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、PCNA、Cyclin D1、Ki67 mRNA 水平升高。相较于同时点 APAP 组, APAP + TAK-242 24 h 组和 48 h 组的 NF- $\kappa$ B、RIP1、RIP3、p-STAT3、PCNA、Cyclin D1 蛋白水平和 TLR4、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、PCNA、Cyclin D1、Ki67 mRNA 水平明显降低; APAP + TAK-242 36 h 组的 NF- $\kappa$ B、PCNA 蛋白水平和 TLR4、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、PCNA、Ki67 mRNA 水平也明显低于 APAP 36 h 组。与对照组相比, APAP 组自噬激活, 而 APAP + TAK-242 组自噬被抑制。结论 TLR4 可能影响 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路, 上调炎症因子和自噬水平, 促进 APAP 诱导的 L02 细胞肝损伤后的肝细胞再生。

**关键词** 对乙酰氨基酚; Toll 受体 4; 肝再生; 自噬; 炎症; 肝损伤

中图分类号 R 575.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)10-1689-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.001

对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 过量是药物性肝损伤诱导的急性肝功能衰竭 (acute liver failure, ALF) 的常见原因<sup>[1]</sup>。多年来, 对 APAP 过量的研究主要集中在肝毒性机制方面, 对 APAP 肝损伤后肝再生机制的探讨还很少, 而肝再生是肝损伤预后的关键决定因素<sup>[2]</sup>。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 作为一种模式识别受体参与炎症反应和组织修复<sup>[3]</sup>。TLR4 被证明有助于肺损伤的修复<sup>[4]</sup>。TLR4 信号的激活可触发核因子- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B), 引起肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (inter-

leukin, IL)-1 $\beta$  和 IL-6 等多种炎症因子的转录和分泌。缺乏 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号的激活可能是 APAP 高毒性剂量后肝脏再生受损的一种机制<sup>[5]</sup>。同时, TLR4 可以通过 NF- $\kappa$ B 信号通路调节自噬<sup>[6]</sup>, 而自噬的消除可能会阻碍肝部分切除术 (partial hepatectomy, PHx) 后的肝再生过程<sup>[7]</sup>。此外, TLR4 下游分子受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor-interacting protein 1, RIP1) 也可以通过泛素化依赖性的方式募集启动 NF- $\kappa$ B 级联激活<sup>[8]</sup>。TLR4 与炎症反应、自噬通路相互作用, 上述过程均可以影响肝脏再生。因此, 该研究的主要目的是阐明 TLR4 是否通过调节炎症反应和自噬在 APAP 引起的急性肝损伤后肝细胞再生过程中发挥作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与主要试剂 人正常肝细胞 L02 由安

2024-07-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 81800524)

作者简介: 乔亚琴, 女, 硕士研究生;

路燕, 女, 副主任医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail:

luyancathrine@163.com

徽医科大学病理生理教研室赠予。APAP(货号 HY-66005)、TAK-242(货号 HY-11109)购自上海 Med-ChemExpress 公司。CCK-8 试剂盒(货号 BS350)购自武汉 Biosharp 公司。信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)(货号 9139)、p-STAT3(货号 9145)、增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen, PCNA)(货号 2586)、微管相关蛋白轻链 3B(microtubule-associated protein light chain 3B, LC3B)(货号 2775)、p62(货号 8025)抗体购自美国 CST 公司;细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1, 货号 60186-1-Ig)、NF- $\kappa$ B(货号 10745-1-AP)购自武汉 proteintech 公司;RIP1(货号 PA5-20811)、RIP3(货号 PA5-19956)抗体购自美国 Thermo Fisher 公司;GAPDH(货号 TA-08)购自北京中杉金桥生物技术公司;特异性引物购自上海生工生物公司;PCR 相关试剂购自上海新贝生物有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 使用 DMEM 高糖培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素)培养人正常肝细胞株 L02, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行孵育, 1~2 d 进行 1 次培养液更换。当细胞融合度达 70%~85% 时进行传代。

**1.2.2 CCK-8 实验** 在 96 孔板中以 10 000 个/孔的密度孵育 L02 细胞过夜。分别用 APAP(1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 mmol/L)作用细胞 24、36、48、72 h, TAK-242(10、50、100、200、1 000 nmol/L)作用细胞 24、36、48 h, 作用后丢弃培养液, 每孔加含 10% CCK-8 的新鲜培养液 110  $\mu$ l。孵育 2 h, 酶标仪 450 nm 处检测吸光度。每组包括五个复孔。重复 3 次实验。细胞活力(%) =  $(OD_{\text{实验}} - OD_{\text{空白对照}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白对照}}) \times 100\%$ 。

**1.2.3 Western blot 实验** 取对数生长期 L02 细胞重悬后均匀接种于 6 孔板, TAK-242 作用 2 h 后, 加入 APAP 继续作用 24、36、48 h, 处理结束后弃去培养液, 用 PBS 冲洗细胞 2 次后每孔加入 100  $\mu$ l 含 1% 蛋白酶抑制剂和 1% 磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 提取细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白定量。灌胶, 恒压电泳(浓缩胶 80 V、30 min; 分离胶 120 V、1 h), 恒流转膜(200 mA, 1.0~1.5 h), 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 一抗 4 °C 过夜(Cyclin D1 为 1:8 000; RIP3 和 PCNA 为 1:2 000; GAPDH、RIP1、NF- $\kappa$ B、LC3B、p62、STAT3、p-STAT3 均为 1:1 000), 二抗室温孵育 50 min。显影, Image J 软件定量分析目的条带吸

光度值。

**1.2.4 qRT-PCR 实验** 6 孔板中每孔加入 1 ml TRIzol 裂解液提取细胞总 RNA, 用分光光度计测定 RNA 浓度。根据说明书操作, 使用 8  $\times$  gDNA remover 和 5  $\times$  RT SuperMix 逆转录为 cDNA。用 LightCycle-480PCR 仪进行扩增, 按 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 循环 39 次, 65 °C、5 s, 95 °C、5 s, 循环结束后通过溶解曲线检测 PCR 扩增产物特异性, 按 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup> 法计算目标基因相对比值。实验中扩增所用引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

Tab. 1 Primer sequences of the genes

Gene name	Primer sequence(5'-3')
TLR4	F:GCATATCAGAGCCTAAGCCACC
	R:TGATAGTCCAGAAAAGGCTCCC
NF- $\kappa$ B	F:AACAGAGAGGATTTCTGTTCCG
	R:TTTGACCTGAGGTAAGACTTCT
IL-6	F:GACAGCCACTCACCTTTCAGAAC
	R:CCAGGCAAGTCTCCTCATTGAATCC
IL-1 $\beta$	F:TACGAATCTCCGACCACCCTACAG
	R:ACACCACTTGTGCTCCATATCCTG
TNF- $\alpha$	F:TGCTCCTCACCCACACCATCAG
	R:TCCCAAAGTAGACCTGCCAGAC
Ki-67	F:CGACGGTCCCACTTTCCTGAG
	R:TGAGACACGACGTGCTGGCTCCTG
PCNA	F:GGCTCCATCTCAAGAAGGTGTTG
	R:CGCGTTATCTTCGGCCCTTAGTG
Cyclin D1	F:TGGATGCTGGAGGTCTGCGAGGAAC
	R:GTGGCAGAGGGCAACGAAGGTC
GAPDH	F:AGCAAGAGCACAAAGAGGAAG
	R:GTTGAGCACAGGCTACTTT

**1.3 统计学处理** 使用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度 APAP 对 L02 细胞活力的影响** 分别用 1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 mmol/L APAP 作用 L02 细胞 24、36、48、72 h, 结果显示 APAP 浓度为 1.0 和 20.0 mmol/L 时, 细胞活力随着作用时间呈逐渐下降趋势, 而浓度为 2.5、5.0、10.0 mmol/L 时, 细胞活力在 24 h 和 36 h 下降, 在 48 h 时出现升高, 表明出现损伤后再生现象。且在浓度为 5.0 mmol/L 时, 48 h 细胞活力(75.43  $\pm$  1.35)% 较 36 h 细胞活力(64.82  $\pm$  1.35)% 升高差异有统计学意义(P < 0.05)。因此, 该研究选择浓度 5.0 mmol/L 作

用 24、36、48 h 模拟 APAP 体外肝损伤及损伤后再生模型。见图 1。

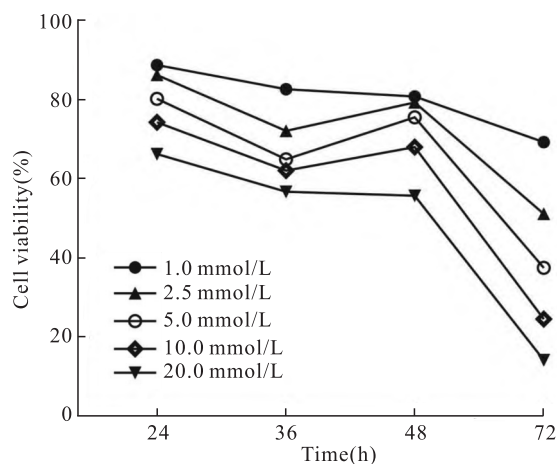


图 1 CCK-8 检测 APAP 对 L02 细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of APAP on L02 cell viability measured by CCK-8

## 2.2 不同浓度 TAK-242 对 L02 细胞活力的影响

分别用 0、10、50、100、200、1 000 nmol/L TAK-242 作用 L02 细胞 24、36、48 h,结果显示在不同时间点各浓度组细胞活力之间差异均无统计学意义,即不同浓度 TAK-242 作用不同时间对细胞活力本身均无影响。结合 TAK-242 说明书,选择 100 nmol/L 作为 TAK-242 后续实验浓度。见图 2。

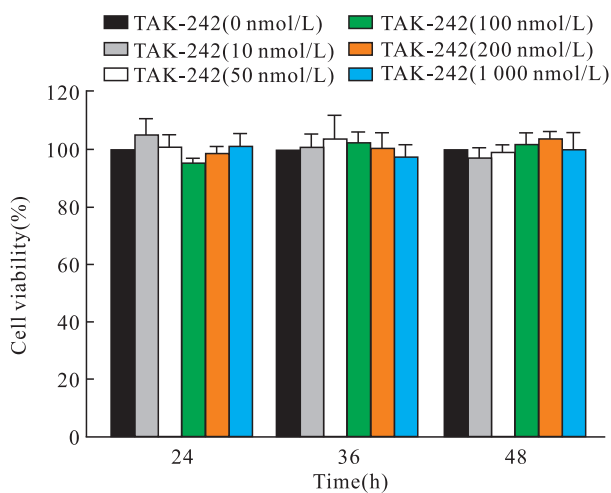


图 2 CCK-8 检测 TAK-242 对 L02 细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of TAK-242 on L02 cell viability measured by CCK-8 assay

## 2.3 抑制 TLR4 对 L02 细胞 TLR4 mRNA 的影响

与对照组相比,APAP 36 h 和 48 h 组 TLR4 mRNA 表达上调 ( $F = 228.5, P < 0.01$ ); APAP + TAK-242 24 h、36 h 及 48 h 组 TLR4 mRNA 较同时间点 APAP 组表达下降 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

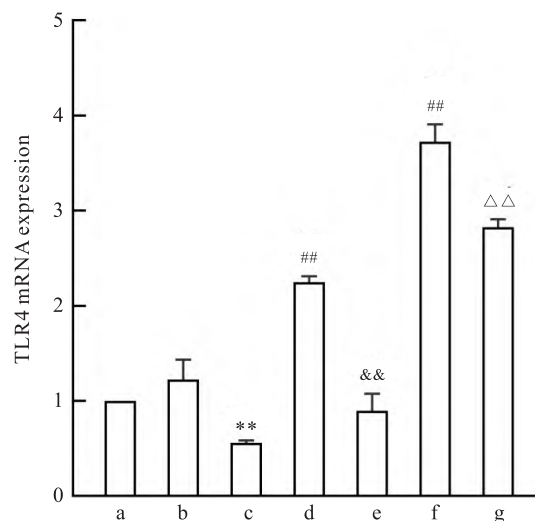


图 3 抑制 TLR4 对 L02 细胞 TLR4 mRNA 的影响

Fig. 3 Effect of TLR4 inhibition on TLR4 mRNA in L02 cells

a: control group; b: APAP 24 h group; c: APAP + TAK-242 24 h group; d: APAP 36 h group; e: APAP + TAK-242 36 h group; f: APAP 48 h group; g: APAP + TAK-242 48 h group; \*\*  $P < 0.01$  vs APAP 24 h group; ##  $P < 0.01$  vs control group; &&  $P < 0.01$  vs APAP 36 h group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs APAP 48 h group.

## 2.4 抑制 TLR4 影响炎症因子 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 在 L02 细胞中的表达

与对照组相比,APAP 24 h 组的 NF- $\kappa$ B 蛋白和 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 水平均升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); APAP 36 h 组的 NF- $\kappa$ B 蛋白和 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 水平均升高 ( $P < 0.01$ ); APAP 48 h 组的 NF- $\kappa$ B 蛋白和 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 水平均升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。APAP + TAK-242 24 h、36 h 和 48 h 组的 NF- $\kappa$ B 蛋白和 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 水平较同时间点 APAP 组均降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 4。

## 2.5 抑制 TLR4 影响自噬相关蛋白 LC3-II 和 p62 在 L02 细胞中的表达

APAP 给药后,诱导了 LC3-II 内源性水平的升高,也导致 p62 的降解,提示 APAP 处理后的肝细胞自噬被激活,自噬流畅畅,且 36 h 时自噬水平最高。而 APAP + TAK-242 阻断自噬下游,抑制了自噬小体在溶酶体中的降解,导致自噬小体在溶酶体中堆积,所以 LC3-II 和 p62 表达量都增加,提示自噬活动被抑制。见图 5。

## 2.6 抑制 TLR4 对 L02 细胞 RIP1 和 RIP3 蛋白表达的影响

与对照组相比,APAP 24 h、36 h 及 48 h 组 RIP1 蛋白水平均升高 ( $F = 35.74, P < 0.01$ ); APAP 36 h 组的 RIP3 水平升高 ( $F = 2.83, P < 0.05$ ); APAP + TAK-242 24 h 和 48 h 组的 RIP1 和

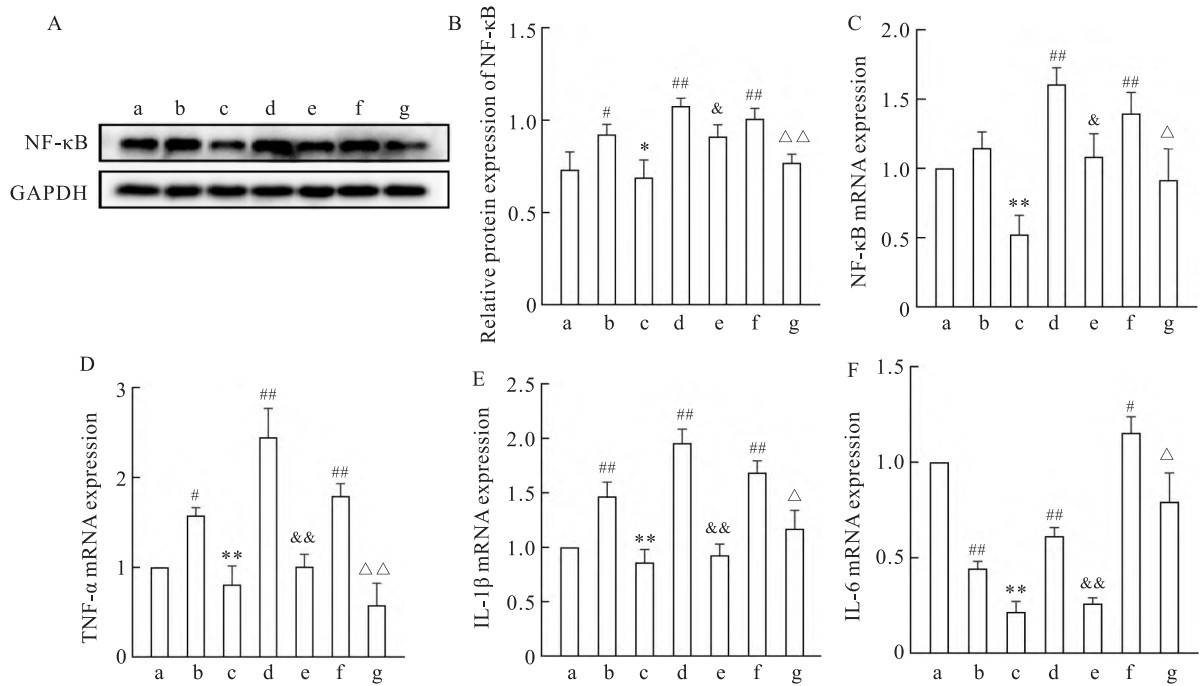


图4 抑制 TLR4 下调炎症因子 NF-κB、TNF-α、IL-1β、IL-6 在 L02 细胞中的表达

Fig. 4 Inhibition of TLR4 down-regulated the expression of inflammatory factors NF-κB, TNF-α, IL-1β, and IL-6 in L02 cells

A, B; Expression of NF-κB protein in L02 cells; C - F; Expression of NF-κB, TNF-α, IL-1β and IL-6 mRNA in L02 cells; a: control group; b: APAP 24 h group; c: APAP + TAK-242 24 h group; d: APAP 36 h group; e: APAP + TAK-242 36 h group; f: APAP 48 h group; g: APAP + TAK-242 48 h group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs APAP 24 h group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs control group; &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$  vs APAP 36 h group; Δ  $P < 0.05$ , ΔΔ  $P < 0.01$  vs APAP 48 h group.

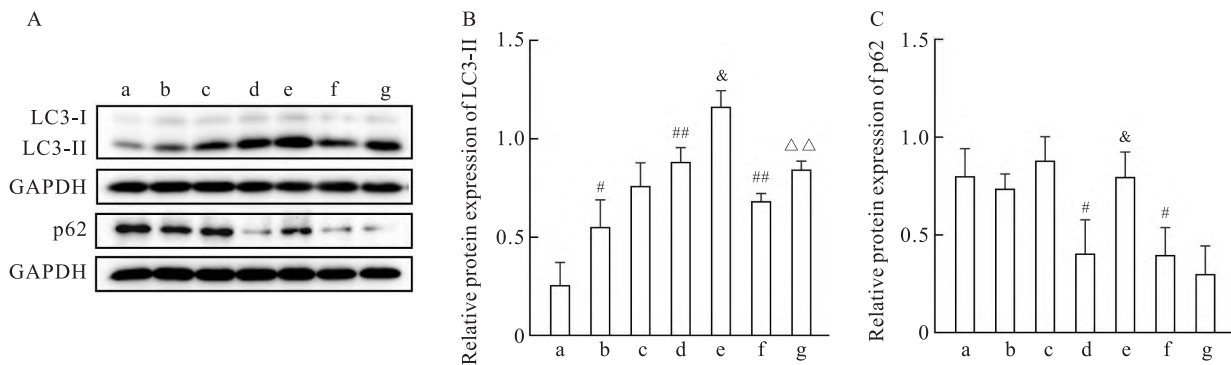


图5 抑制 TLR4 抑制 L02 细胞自噬

Fig. 5 Inhibition of TLR4 inhibits autophagy in L02 cells

A - C; Expression of LC3 and p62 protein in L02 cells; a: control group; b: APAP 24 h group; c: APAP + TAK-242 24 h group; d: APAP 36 h group; e: APAP + TAK-242 36 h group; f: APAP 48 h group; g: APAP + TAK-242 48 h group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs control group; &  $P < 0.05$  vs APAP 36 h group; Δ  $P < 0.05$ , ΔΔ  $P < 0.01$  vs APAP 48 h group.

RIP3 蛋白较同时间点 APAP 组下降 ( $P < 0.05$ )。见图 6。

**2.7 抑制 TLR4 影响 p-STAT3、PCNA、Cyclin D1、Ki-67 在 L02 细胞中的表达** 与对照组相比, APAP 24 h 组的 p-STAT3、PCNA、Cyclin D1 蛋白和 PCNA mRNA 水平均升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );

APAP 36 h 组的 p-STAT3、PCNA、Cyclin D1 蛋白和 PCNA、Cyclin D1 mRNA 水平升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); APAP 48 h 组的 p-STAT3、PCNA、Cyclin D1 蛋白和 PCNA、Cyclin D1、Ki67 mRNA 水平升高 ( $P < 0.01$ )。而 APAP + TAK-242 24 h 组和 48 h 组的 p-STAT3、PCNA、Cyclin D1 蛋白和 PCNA、Cyclin D1、

Ki67 mRNA 水平明显低于同时间点 APAP 组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); APAP + TAK-242 36 h 组的 PCNA 蛋白和 PCNA、Ki67 mRNA 水平也明显低于 APAP 36 h 组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 7。

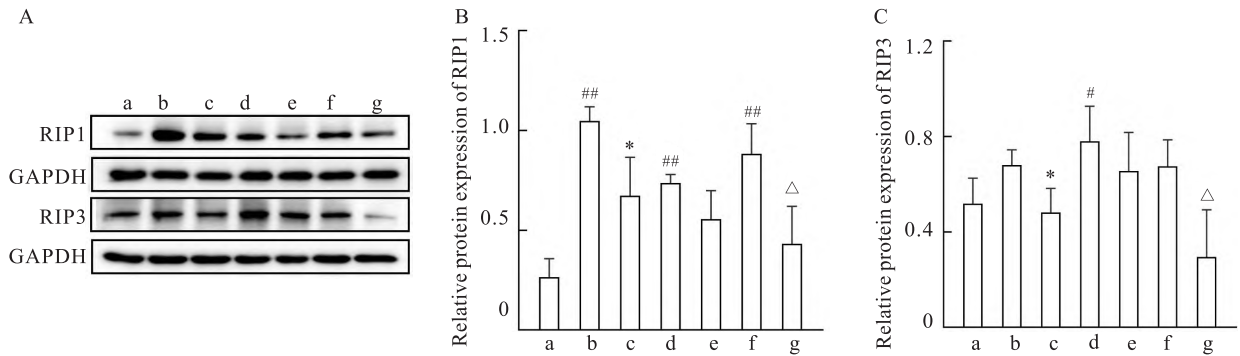


图 6 抑制 TLR4 对 L02 细胞 RIP1 和 RIP3 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of TLR4 inhibition on RIP1 and RIP3 protein expression in L02 cells

A - C: Expression of RIP1 and RIP3 protein in L02 cells; a: control group; b: APAP 24 h group; c: APAP + TAK-242 24 h group; d: APAP 36 h group; e: APAP + TAK-242 36 h group; f: APAP 48 h group; g: APAP + TAK-242 48 h group; \*  $P < 0.05$  vs APAP 24 h group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs control group; Δ  $P < 0.05$  vs APAP 48 h group.

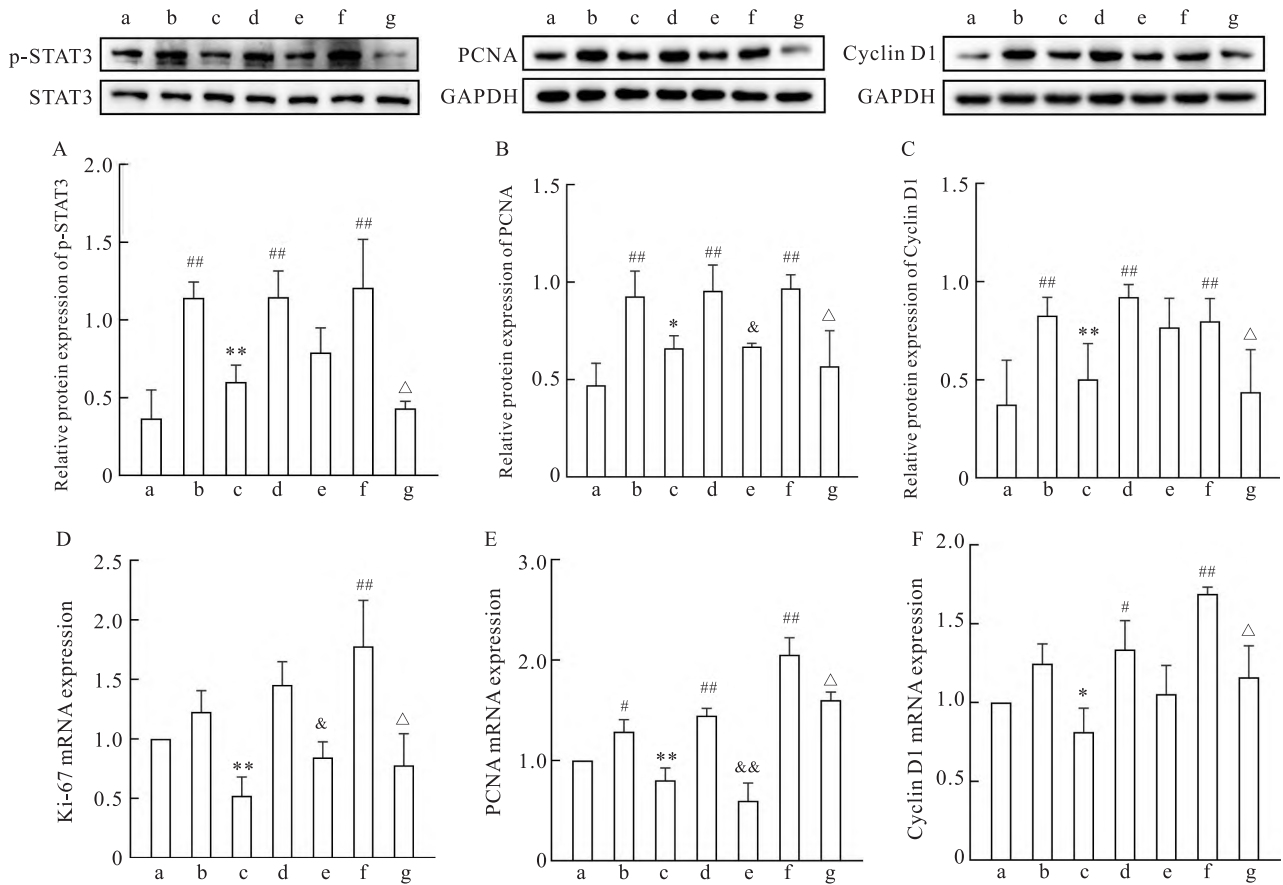


图 7 抑制 TLR4 下调 p-STAT3、PCNA、Cyclin D1 和 Ki-67 的蛋白和 mRNA 表达水平

Fig. 7 Inhibition of TLR4 downregulated the protein and mRNA expression levels of p-STAT3, PCNA, Cyclin D1, and Ki-67

A - C: Expression of p-STAT3, PCNA and Cyclin D1 proteins in L02 cells; D - F: Expression of Ki67, PCNA, Cyclin D1 mRNA in L02 cells; a: control group; b: APAP 24 h group; c: APAP + TAK-242 24 h group; d: APAP 36 h group; e: APAP + TAK-242 36 h group; f: APAP 48 h group; g: APAP + TAK-242 48 h group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs APAP 24 h group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs control group; &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$  vs APAP 36 h group; Δ  $P < 0.05$  vs APAP 48 h group.

### 3 讨论

APAP 是世界上使用最广泛的非处方镇痛和解热药物之一,在治疗剂量下是安全的,但过量会导致 ALF。目前使用的唯一有效解毒剂是 N-乙酰半胱氨酸,也因其狭窄的治疗窗口而限制了其使用,肝移植是目前治疗肝衰竭的最有效方法。鉴于 APAP 使用的普遍性以及治疗的局限性,研究和阐明 APAP 肝毒性的分子机制以及寻找新的治疗靶点,已成为 APAP 肝毒性研究亟待解决的重要问题。任何原因的急性肝损伤,包括 APAP 过量,都会发生代偿性肝再生,即使在 APAP 过量的后期阶段,肝再生也有潜在的调节作用。刺激 APAP 诱导的 ALF 患者的肝再生可能是一种潜在的治疗策略。

TLR4 引起固有免疫系统的激活是肝再生的重要刺激因素<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10]</sup>表明,一些源自肠道微生物群的化合物可以通过上调 TLR4 激活介导的炎症细胞因子来促进肝再生。TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路在 PHx 后肝脏再生中发挥了重要作用<sup>[11]</sup>。抑制 STAT3 后可明显降低四氯化碳诱导的小鼠肝再生能力<sup>[12]</sup>。在该研究中,使用 L02 肝细胞建立 APAP 损伤及损伤后再生模型,利用 TLR4 拮抗剂 TAK-242 进行研究表明,TAK-242 可下调 TLR4 mRNA、NF- $\kappa$ B 蛋白和 mRNA 的表达;同时,抑制 TLR4 后再生相关指标 Cyclin D1、PCNA、Ki-67 蛋白及 mRNA 水平均下降,其中伴随着 p-STAT3 蛋白水平的下调,提示 TLR4 可能影响 NF- $\kappa$ B 途径促进 APAP 肝损伤后的肝细胞再生。

TLR4 激活下游 NF- $\kappa$ B 后可进一步诱导炎症因子的表达并参与自噬反应。有研究<sup>[13]</sup>表明,TAK-242 可通过 TLR4 下游转录分子 NF- $\kappa$ B 信号级联抑制神经炎症和神经元自噬。而炎症因子 TNF- $\alpha$  水平的增加可以触发 NF- $\kappa$ B 途径并促进 Cyclin D1 蛋白的表达,TNF- $\alpha$ 、IL-6 被证明参与 APAP 过量后的肝脏再生<sup>[2-3,14]</sup>。此外,促进自噬可能通过促进肝脏再生而轻微改善 APAP 肝损伤晚期小鼠的存活率<sup>[15]</sup>。在该研究中,抑制 TLR4 可下调炎症因子(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6)的分泌,同时也抑制了自噬,表明 TLR4/NF- $\kappa$ B 下游的炎症因子和自噬反应可能参与了 APAP 肝损伤中促进肝再生的过程。

RIP1 作为 TLR 家族下游的中心枢纽,在控制细胞生死平衡的信号事件中具有关键作用,一方面作为激酶功能诱导 RIP3/MLKL 介导的程序性坏死,另一方面作为肝细胞的促存活支架出现,且其促生存

作用可能主要是通过激活 NF- $\kappa$ B 来介导的,并可在上述功能之间转换<sup>[8]</sup>。在该研究中,抑制 TLR4 后 RIP1、RIP3 蛋白水平均下降,说明 TLR4 参与 APAP 肝损伤过程中的程序性坏死,同时,推测炎症因子在本实验中发挥促生存作用的关键因素可能与 RIP1 的功能转换有关。

综上所述,TLR4 可能影响 NF- $\kappa$ B 信号,从而调节炎症反应和自噬,对 APAP 诱导的 L02 细胞肝损伤后的肝细胞再生起到一定的促进作用。但肝脏再生是一个涉及多通路和途径的复杂过程,因此对于 TLR4 在 APAP 肝损伤后肝再生中的作用机制还需要更多的研究。

### 参考文献

- [1] Björnsson H K, Björnsson E S. Drug-induced liver injury: pathogenesis, epidemiology, clinical features, and practical management[J]. *Eur J Intern Med*, 2022, 97: 26–31. doi:10.1016/j.ejim.2021.10.035.
- [2] Bhushan B, Apte U. Liver regeneration after acetaminophen hepatotoxicity: mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(4): 719–29. doi:10.1016/j.ajpath.2018.12.006.
- [3] Mills S J, Ahangar P, Thomas H M, et al. Flightless I negatively regulates macrophage surface TLR4, delays early inflammation, and impedes wound healing[J]. *Cells*, 2022, 11(14): 2192. doi:10.3390/cells11142192.
- [4] Liang J, Zhang Y, Xie T, et al. Hyaluronan and TLR4 promote surfactant-protein-C-positive alveolar progenitor cell renewal and prevent severe pulmonary fibrosis in mice[J]. *Nat Med*, 2016, 22(11): 1285–93. doi:10.1038/nm.4192.
- [5] Yang T, Wang H, Wang X, et al. The dual role of innate immune response in acetaminophen-induced liver injury[J]. *Biology*, 2022, 11(7): 1057. doi:10.3390/biology11071057.
- [6] Zhang K, Huang Q, Deng S, et al. Mechanisms of TLR4-mediated autophagy and nitrosidative stress[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 766590. doi:10.3389/fcimb.2021.766590.
- [7] Chen Y, Xu Z, Zeng Y, et al. Altered metabolism by autophagy defect affect liver regeneration[J]. *PLoS One*, 2021, 16(4): e0250578. doi:10.1371/journal.pone.0250578.
- [8] Tang D, Kang R, Berghe T V, et al. The molecular machinery of regulated cell death[J]. *Cell Res*, 2019, 29(5): 347–64. doi:10.1038/s41422-019-0164-5.
- [9] Abu Rmilah A, Zhou W, Nelson E, et al. Understanding the marvels behind liver regeneration[J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2019, 8(3): e340. doi:10.1002/wdev.340.
- [10] Hu C Q, Bo Q L, Chu L L, et al. Vitamin D deficiency aggravates hepatic oxidative stress and inflammation during chronic alcohol-induced liver injury in mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 5715893. doi:10.1155/2020/5715893.
- [11] Lv M, Zeng H, He Y, et al. Dexmedetomidine promotes liver re-

- generation in mice after 70% partial hepatectomy by suppressing NLRP3 inflammasome not TLR4/NF $\kappa$ B[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 46–51. doi:10.1016/j.intimp.2017.10.030.
- [12] Nash E, Sabih A H, Chetwood J, et al. Drug-induced liver injury in Australia, 2009-2020: the increasing proportion of non-paracetamol cases linked with herbal and dietary supplements[J]. *Med J Aust*, 2021, 215(6): 261–8. doi:10.5694/mja2.51173.
- [13] Feng Y, Gao J, Cui Y, et al. Neuroprotective effects of resatorvid against traumatic brain injury in rat: involvement of neuronal autophagy and TLR4 signaling pathway[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(1): 155–68. doi:10.1007/s10571-016-0356-1.
- [14] 郁福乾, 宋莎莎, 路燕, 等. IL-6 在对乙酰氨基酚肝损伤后再生中的作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(6): 866–71. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.005.
- [14] Yu F Q, Song S S, Lu Y, et al. Research of IL-6 in liver regeneration after APAP-induced acute liver injury[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(6): 866–71. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.005.
- [15] Sun H, Ni H M, McCracken J M, et al. Liver-specific deletion of mechanistic target of rapamycin does not protect against acetaminophen-induced liver injury in mice[J]. *Liver Res*, 2021, 5(2): 79–87. doi:10.1016/j.livres.2021.03.001.

## TLR4 affects hepatocyte regeneration after acetaminophen-induced injury by modulating inflammatory response and autophagy

Qiao Yaqin<sup>1,2</sup>, Shen Haitao<sup>1</sup>, Dong Ping<sup>1</sup>, Lu Yan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

<sup>2</sup>Dept of Gastroenterology, The Chinese People's Liberation Army 986th Hospital of The Air Force, Xi'an 710018)

**Abstract Objective** To investigate the role of Toll-like receptor 4 (TLR4) in hepatocyte regeneration after acetaminophen (APAP) -induced injury in human normal liver cell (L02) and its possible mechanism. **Methods** L02 cells were cultured *in vitro*, and cell viability was detected by CCK-8 assay. The optimal concentration and duration of APAP and the concentration of TLR4 inhibitor (TAK-242) were determined. The protein expression levels of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), p62, receptor interacting protein kinase 1 (RIP1), receptor interacting protein kinase 3 (RIP3), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), phosphorylation of STAT3 (p-STAT3), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cyclin D1 were detected by Western blot. The mRNA expression levels of TLR4, NF- $\kappa$ B, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), PCNA, Cyclin D1 and Ki67 were detected by qRT-PCR. **Results** According to the results of CCK-8, L02 cells were treated with 5 mmol/L APAP for 24, 36, 48 h to simulate liver injury and regeneration model *in vitro*, and TAK-242 100 nmol/L was pretreated 2 h before APAP to inhibit TLR4. Compared with the control group, the protein levels of NF- $\kappa$ B, RIP1, p-STAT3, PCNA, Cyclin D1 and the mRNA levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and PCNA increased in the APAP 24 h group; the protein levels of NF- $\kappa$ B, RIP1, RIP3, p-STAT3, PCNA, Cyclin D1 and the mRNA levels of TLR4, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PCNA and Cyclin D1 increased in the APAP 36 h group; the protein levels of NF- $\kappa$ B, RIP1, p-STAT3, PCNA, Cyclin D1 and the mRNA levels of TLR4, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PCNA, Cyclin D1 and Ki67 increased in the APAP 48 h group. The protein levels of NF- $\kappa$ B, RIP1, RIP3, p-STAT3, PCNA, Cyclin D1 and the mRNA levels of TLR4, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PCNA, Cyclin D1, Ki67 significantly decreased in APAP + TAK-242 24 h and 48 h group than the APAP group at the same time point; the protein levels of NF- $\kappa$ B, PCNA and the mRNA levels of TLR4, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PCNA and Ki67 in APAP + TAK-242 36 h group were also significantly lower than those in APAP 36 h group. Compared with the control group, autophagy was activated in the APAP group, while autophagy was inhibited in the APAP + TAK-242 group. **Conclusion** TLR4 may affect the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway, up-regulate the levels of inflammatory factors and autophagy, and promote hepatocyte regeneration after APAP-induced liver injury in L02 cells.

**Key words** acetaminophen; Toll-like receptor 4; liver regeneration; autophagy; inflammatory; liver injury

**Fund program** National Natural Science Foundation of China(No. 81800524)

**Corresponding author** Lu Yan, E-mail: luyancathrine@163.com