

# Toll样受体4调控的程序性坏死和铁死亡 对对乙酰氨基酚肝损伤的影响

沈海涛, 乔亚琴, 董萍, 路燕

(安徽医科大学第二附属医院消化内科, 安徽 合肥 230031)

**摘要:** **目的** 探究 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4) 是否通过调控程序性坏死及铁死亡进一步影响对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP) 肝损伤过程及其发生机制。 **方法** 体外培养人正常肝细胞 L-02, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, 筛选出最佳 APAP 和 TAK-242 浓度。将实验分为对照组、APAP 组(1、4、12 h) 和 APAP+TAK-242 组(1、4、12 h), 比较各组细胞 TLR4 mRNA 表达; 检测各组细胞匀浆液的丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST) 水平; 检测各组细胞核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 水平; 检测各组细胞高迁移率族蛋白 1(high mobility group box 1, HMGB1)、受体相互作用蛋白激酶 1(receptor interacting protein kinase 1, RIP1)、受体相互作用蛋白激酶 3(receptor interacting protein kinase 3, RIP3); 检测各组细胞内 Fe<sup>2+</sup> 含量以及 NF- $\kappa$ B、P53、重组溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4) 水平。 **结果** 通过 CCK-8 法, 确定 5 mmol/L APAP 和 100 nmol/L TAK-242 作为后续实验浓度。与对照组比较, 各时间点 APAP 组 TLR4 mRNA 水平上调( $P < 0.05$ ); 与 APAP 组比较, 同一时间点 APAP+TAK-242 组 TLR4 mRNA 水平下调( $P < 0.05/3 = 0.0167$ )。与对照组比较, 各时间点 APAP 组 ALT、AST 水平升高( $P < 0.05$ ); 与 APAP 组比较, 同一时间点 APAP+TAK-242 组 ALT、AST 水平下降( $P < 0.05/3 = 0.0167$ )。与对照组比较, 各时间点 APAP 组 NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达均上调( $P < 0.05$ ); 与 APAP 组比较, 同一时间点 APAP+TAK-242 组 NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达均下调( $P < 0.05/3 = 0.0167$ )。与对照组比较, 各时间点 APAP 组 HMGB1、RIP1、RIP3 蛋白水平均升高( $P < 0.05$ ); 与 APAP 组比较, 同一时间点 APAP+TAK-242 组 HMGB1、RIP1、RIP3 蛋白水平均降低( $P < 0.05/3 = 0.0167$ )。与对照组比较, 各时间点 APAP 组 Fe<sup>2+</sup> 含量、NF- $\kappa$ B 和 P53 蛋白水平均上升( $P < 0.05$ ), 而 SLC7A11 和 GPX4 蛋白水平和 mRNA 表达均降低( $P < 0.05$ ); 与 APAP 组比较, 同一时间点 APAP+TAK-242 组 Fe<sup>2+</sup> 含量、NF- $\kappa$ B 和 P53 蛋白水平均降低( $P < 0.05/3 = 0.0167$ ), 而 SLC7A11 和 GPX4 蛋白水平和 mRNA 表达均升高( $P < 0.05/3 = 0.0167$ )。 **结论** 抑制 TLR4 可通过调节 TLR4/HMGB1 信号通路下调程序性坏死, 以及可能通过调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路下调炎症反应和铁死亡来减轻 APAP 肝损伤。

**关键词:** 对乙酰氨基酚; Toll 样受体 4; 程序性坏死; 铁死亡; 炎症

中图分类号: R575

文献标志码: A

## Effects of programmed necrosis and ferroptosis regulated by toll-like receptor 4 on acetaminophen-induced liver injury

SHEN Haitao, QIAO Yaqin, DONG Ping, LU Yan

(Department of Gastroenterology, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230031, Anhui, China)

**Abstract: Objective** To explore whether toll-like receptor 4 (TLR4) further affects the process of acetaminophen (APAP) induced liver injury and its mechanism by regulating programmed necrosis and ferroptosis. **Methods** Human

normal hepatocytes L-02 were cultured *in vitro* and cell viability was detected by the CCK-8 method, and the concentrations of APAP and TAK-242 were evaluated. The experiment was divided into control group, APAP groups (1, 4, 12 h) and APAP+TAK-242 groups (1, 4, 12 h), and the TLR4 mRNA levels were compared in each group. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in cell homogenates of different groups were detected; The levels of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were detected in each group; The levels of high mobility group box 1 (HMGB1), receptor interacting protein kinase 1 (RIP1) and receptor interacting protein kinase 3 (RIP3) were detected in each group; The intracellular Fe<sup>2+</sup> content and the level of NF- $\kappa$ B, P53, recombinant solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), glutathione peroxidase 4 (GPX4) were detected in each group. **Results** The concentration of 5 mmol/L APAP and 100 nmol/L TAK-242 was determined by the CCK-8 method. Compared to the control group, the TLR4 mRNA levels of the APAP groups were positively regulated at each time point ( $P < 0.05$ ); Compared to the APAP groups, the levels of TLR4 mRNA in the APAP+TAK-242 groups were negatively regulated at the corresponding time points ( $P < 0.05/3 = 0.0167$ ). Compared to the control group, the levels of ALT and AST in the APAP groups increased at each time point ( $P < 0.05$ ); Compared to the APAP groups, the levels of ALT and AST in the APAP+TAK-242 groups decreased at the corresponding time points ( $P < 0.05/3 = 0.0167$ ). Compared to the control group, the mRNA expressions of NF- $\kappa$ B, IL-6 and TNF- $\alpha$  were up-regulated in the APAP groups at each time point ( $P < 0.05$ ); Compared to the APAP groups, the mRNA expressions of NF- $\kappa$ B, IL-6 and TNF- $\alpha$  were all down-regulated in the APAP+TAK-242 groups at the corresponding time points ( $P < 0.05/3 = 0.0167$ ). Compared to the control group, the levels of HMGB1, RIP1, and RIP3 increased in the APAP groups at all time points ( $P < 0.05$ ); Compared to the APAP groups, the levels of HMGB1, RIP1, and RIP3 decreased in the APAP+TAK-242 groups at the corresponding time points ( $P < 0.05/3 = 0.0167$ ). Compared to the control group, the content of Fe<sup>2+</sup>, NF- $\kappa$ B and P53 was increased ( $P < 0.05$ ), but the levels of SLC7A11 and GPX4 decreased in the APAP groups at all time points ( $P < 0.05$ ); Compared to the APAP groups, the content of Fe<sup>2+</sup>, NF- $\kappa$ B and P53 were decreased ( $P < 0.05/3 = 0.0167$ ), but the levels of SLC7A11 and GPX4 increased in the APAP+TAK-242 groups at the corresponding time points ( $P < 0.05/3 = 0.0167$ ). **Conclusion** Inhibition of TLR4 can negatively regulate programmed necrosis by regulating the TLR4/HMGB1 signaling pathway and can negatively regulate the inflammatory response and ferroptosis by regulating TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway to alleviate APAP-induced liver injury.

**Key words:** Acetaminophen; Toll-like receptor 4; Programmed necrosis; Ferroptosis; Inflammation

药物性肝损伤是目前很常见、很严重的药物不良反应之一,如不及时治疗,可能导致肝功能衰竭,甚至死亡;而对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是药物性肝损伤和急性肝衰竭的常见原因<sup>[1]</sup>。目前已对 APAP 诱导的肝损伤机制进行了充分研究<sup>[1-3]</sup>,但其治疗方法有限。因此需要开发一个新的治疗靶点,为减轻 APAP 诱导的肝损伤提供理论指导。

Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 作为 Toll 样受体家族的一员,在炎症反应、程序性坏死和铁死亡中发挥着重要作用<sup>[4-7]</sup>。TLR4 通过 MyD88 依赖性途径激活下游的核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B),从而诱导炎症因子的表达<sup>[8]</sup>。有研究表明,抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路通过调节炎症反应来减轻脂多糖所致肝损伤<sup>[9]</sup>。此外,程序性坏死作为细胞死亡的一种方式,也参与药物性肝损伤的发病过程。有研究表明,TLR4 诱导的程序性坏死在炎症疾病中发挥着重要作用,并且抑制 TLR4 可以减轻相关炎症疾病<sup>[10-11]</sup>。还有研究表明,刀豆球蛋白-A (concanavalin-A, Con-A) 介导的自身免疫

性肝炎中存在程序性坏死,并且抑制受体相互作用蛋白激酶 3 (receptor interacting protein kinases3, RIP3) 可以减轻肝损伤<sup>[12]</sup>。最近的研究还发现,铁死亡在肝脏疾病中也发挥着重要作用,如肝纤维化、非酒精性脂肪肝、肝硬化、肝细胞癌等<sup>[13]</sup>。其中重组溶质载体家族 7 成员 11 (recombinant solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)/谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 是铁死亡的主要信号通路之一。有研究发现,NF- $\kappa$ B 不仅诱导炎症反应,而且还可以介导下游的 P53 下调 SLC7A11 的表达诱导铁死亡<sup>[14]</sup>。另有研究报道,通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路来调节铁死亡,从而减轻中暑引起的心肌损伤<sup>[15]</sup>。上述研究表明,TLR4 与炎症反应、程序性坏死和铁死亡信号通路相互作用,并且上述过程可以影响多种肝损伤的结局。那么,抑制 TLR4 是否可以下调程序性坏死及铁死亡通路而进一步减轻 APAP 肝损伤。

TAK-242 作为一种 TLR4 抑制剂,可以选择性抑制 TLR4 信号,从而导致炎症因子(IL-6、TNF- $\alpha$ )

等)释放减少<sup>[16]</sup>。于是我们在体外构建了 APAP 诱导的早期肝损伤模型,通过 TAK-242 预处理,旨在初步探讨抑制 TLR4 是否可以减轻 APAP 早期肝损伤及可能的机制,为 TLR4 是否可作为 APAP 肝损伤新的治疗靶点提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞和主要试剂

人正常肝细胞 L-02 由安徽医科大学毒理学实验室提供;南美胎牛血清购自美国 Gibco 公司;APAP、TLR4 抑制剂 TAK-242、HMGB1 抗体、GAPDH 抗体、RIP1 抗体、RIP3 抗体购自美国 MedChemExpress 公司;CCK8 试剂盒和细胞亚铁比色法试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;NF- $\kappa$ B 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;P53 抗体、SLC7A11 抗体、GPX4 抗体购自江苏亲科生物研究中心有限公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;ALT/AST 测定试剂盒(微板法)购自南京建成生物工程研究所。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养方法

人类正常肝细胞 L-02 在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基中培养,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2 d 后,待细胞长至培养皿的 75%~85% 时,即可进行传代。

#### 1.2.2 CCK-8 实验方法

培养细胞至对数生长期,转移至离心管中重悬,利用细胞计数板来计数细胞,并将细胞密度稀释至  $1.0 \times 10^5$  个/mL,在每个 96 孔板孔中放置 100  $\mu$ L 细胞悬液,静置 12 h,待细胞贴壁后,用 PBS 冲洗 2 遍,再将 96 孔板倒置在滤纸上吸净水分,分别加入 2.5、5、10、20 mmol/L APAP 作用 1、4、12 h,检测 APAP 浓度对 L-02 细胞活力的影响,筛选出最终 APAP 浓度。

操作同前,分别加入不同浓度(10、50、100、200、1 000 nmol/L) TAK-242 作用 1、4、12 h,检测其对 L-02 细胞活力的影响;分别加入上述浓度 TAK-242(0、10、50、100、200、1 000 nmol/L) 于 L-02 细胞作用 2 h, PBS 冲洗 2 遍,再加入 APAP(5 mmol/L),分别在 1、4、12 h 检测细胞活力,综合选出最佳 TAK-242 浓度。空白对照孔均加入 100  $\mu$ L 培养基,再添加 10  $\mu$ L CCK8 试剂孵育 120 min,在 450 nm 波长处用酶标仪测定每个孔的吸光度值。每组设置 5

个复孔,共进行 3 次重复实验。细胞活力的计算公式:细胞活力(%) = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)  $\times$  100%

#### 1.2.3 细胞分组及处理

在筛选出最佳 APAP 和 TAK-242 浓度后,将细胞分为 7 组,分别为对照组、APAP 组(1、4、12 h) 和 APAP+TAK-242 组(1、4、12 h)。APAP+TAK-242 组(1、4、12 h) 在给药前予以 TAK-242 预处理 2 h。

#### 1.2.4 丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)的测定

将各组 L-02 细胞用 PBS 清洗 2~3 次,然后转移至离心管后,离心(1 300  $\times$ g、5 min),将上清液弃去,留下细胞沉淀,加入匀浆介质(0.1 mol/L pH7~7.4 磷酸盐缓冲液),冰浴条件下用 1 mL 注射器反复抽吸,制备好的匀浆液不离心,然后按照各自说明书操作,检测其浓度。

#### 1.2.5 细胞亚铁含量的检测

将各组 L-02 细胞用 PBS 清洗 2~3 次,随即通过细胞计数板计算细胞数量,按约  $1 \times 10^6$  个细胞加入 0.2 mL 缓冲液,混匀后放置在冰盒上裂解 10 min,15 000  $\times$ g、离心 10 min,取上清液备用。然后按照说明书操作,检测各组细胞 Fe<sup>2+</sup> 含量。

#### 1.2.6 Western blotting 实验

将各组 L-02 细胞置冰上裂解 30 min,用细胞刮迅速刮下细胞至离心管中离心(13 200  $\times$ g),留取细胞上清液。BCA 法测定各组蛋白含量,并将浓度稀释至同一浓度,在恒温金属浴仪器中以 100 °C 的条件加热 10 min。对各组蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, PBS 清洗 3 次,将相应条带放入高迁移率族蛋白 1(high mobility group box1, HMGB1)、受体相互作用蛋白激酶 1(receptor interacting protein kinase1, RIP1)、RIP3、NF- $\kappa$ B、P53、GPX4 一抗(均为 1:1 000 稀释), SLC7A11 一抗,1:500 稀释,以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 1:10 000 稀释)中,在 4 °C 冰箱孵育 12 h。洗膜 3 次,将条带放入相应二抗(山羊抗兔 IgG 1:20 000、山羊抗小鼠 IgG 1:10 000)中,慢摇孵育 1 h。洗膜 3 次。采用超敏发光显影剂对条带进行显影,并使用 Tanon 化学发光显影仪对条带进行曝光和拍摄。采用 Image J 软件计算目的蛋白与内参蛋白 GAPDH 的灰度值比值,确定各蛋白的相对表达量。

#### 1.2.7 RT-qPCR 实验

将各组细胞转移至 6 孔板中,每孔加入 Trizol

试剂 1 mL, 提取细胞 RNA, 用分光光度计测定 RNA 浓度并稀释定量为 1 000 ng。根据说明书操作, 加入  $\times 8$  gDNA remover 2  $\mu$ L, 使用去 RNA 酶水补足至 16  $\mu$ L, 混匀 42  $^{\circ}$ C 水浴加热 2 min, 随后加入  $\times 5$  RT SuperMix 4  $\mu$ L, 逆转录。取逆转录产物 cDNA 1  $\mu$ L, 预混引物 0.4  $\mu$ L、DEPC 水 3.6  $\mu$ L 以及  $\times 2$  S6 Universal SYBR 5  $\mu$ L 配成总体积 10  $\mu$ L。扩增用 LightCycle-480 PCR 仪, 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 循环 40 次, 95  $^{\circ}$ C、5 s, 65  $^{\circ}$ C、5 s, 通过熔解曲线分析检测 PCR 扩增产物质量, 按  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算损伤相关基因相对比值。特异性引物序列为: GAPDH-F: AGCAAGAGCACAAGAGGAAG; GAPDH-R: GGTTGAGCACAGGGTACTTT; TLR4-F: GCATATCAGAGCCTAAGCCACC; TLR4-R: TGATAGTCCAGAAAAGGCTCCC; NF- $\kappa$ B-F: AACAGAGAGGATTCGTTTCCG; NF- $\kappa$ B-R: TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT; TNF- $\alpha$ -F: TGCTCCTCACCCACACCATCAG; TNF- $\alpha$ -R: TCCCAAAGTAGACCTGCCAGAC; IL-6-F: GACAGCCACTCACCTCTTCAAGAAC; IL-6-R: CCAGGCAAGTCTCCTCATTGAATCC; SLC7A11-F: TCCTGCTTGCTC-CATGAAGG; SLC7A11-R: AGAGGAGTGTGCTT-

GCGGACAT; GPX4-F: ACAAGAACGGCTGCGTG-GTGAA; GPX4-R: GCCACACACTTGTGGAGC-TA-GA。

### 1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。所有计量资料均满足正态分布, 含有两个因素的组间比较采用两因素方差分析; 各时间点 APAP 组与对照组进行单因素方差分析, 然后再对各时间点 APAP 组与对照组进行 Dunnett's *t* 检验; 各时间点 APAP 组与 APAP+TAK-242 组的比较采用两样本 *t* 检验, 并校正  $\alpha$  水准, 取  $\alpha' = 0.05/3 = 0.0167$ 。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 APAP 对 L-02 细胞活力的影响

与对照组比较, 2.5 mmol/L APAP 组的细胞活力在 1、4、12 h 均无明显降低, 而 5、10、20 mmol/L APAP 组的细胞活力在 1、4、12 h 均有不同程度的降低 ( $P$  均  $< 0.05$ )。因此选择最低浓度 5 mmol/L APAP 浓度构建体外 APAP 早期肝损伤模型。见表 1。

表 1 不同浓度 APAP 对 L-02 细胞活力的影响/%

Table 1 Effect of different concentrations of APAP on the viability of L-02 cells/%

组别	1 h	4 h	12 h
对照组	100.00	100.00	100.00
2.5 mmol/L APAP	105.30 $\pm$ 5.11	100.40 $\pm$ 2.73	99.87 $\pm$ 0.56
5 mmol/L APAP	91.61 $\pm$ 0.54*	84.63 $\pm$ 1.98*	91.67 $\pm$ 0.33*
10 mmol/L APAP	92.52 $\pm$ 2.80*	86.21 $\pm$ 2.56*	90.65 $\pm$ 5.47*
20 mmol/L APAP	90.29 $\pm$ 2.36*	86.63 $\pm$ 2.70*	85.99 $\pm$ 4.91*

\*  $P < 0.05$  vs 同一时间对照组。

### 2.2 TAK-242 对对照组和 APAP 组细胞活力的影响

将不同浓度 (10、50、100、200、1 000 nmol/L) TAK-242 加入 L-02 细胞中, 于 1、4、12 h 检测各组细胞活力。结果显示, 与对照组相比较, 10、50、100、200、1 000 nmol/L TAK-242 组的细胞活力在各个时间点均无明显差异, 表明 TAK-242 对 L-02 细胞本身无影响。于是我们在 APAP (5 mmol/L) 给药前 2 h, 加入上述浓度的 TAK-242 预处理, 分别在 1、4、

12 h 检测各组细胞活力。结果显示, 与 1、4 h APAP 组比较, 相应时间 APAP+TAK-242 组 (10、50、100、200 nmol/L) 细胞活力均有不同程度的增加 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 与 12 h APAP 组比较, 12h APAP+TAK-242 组 (50、100、200 nmol/L) 细胞活力也均有所上升 ( $P$  均  $< 0.05$ )。结合 TAK-242 说明书, 最终选择 TAK-242 100 nmol/L 为后续实验处理浓度。见表 2、3。

表 2 不同浓度 TAK-242 对 L-02 细胞活力的影响/%

Table 2 Effect of different concentrations of TAK-242 on the viability of L-02 cells/%

组别	1 h	4 h	12 h
对照组	100.00	100.00	100.00
10 nmol/L TAK-242	99.88 $\pm$ 0.39	100.20 $\pm$ 2.15	99.99 $\pm$ 2.08
50 nmol/L TAK-242	99.11 $\pm$ 0.69	101.00 $\pm$ 1.16	98.75 $\pm$ 1.36
100 nmol/L TAK-242	101.00 $\pm$ 1.16	99.85 $\pm$ 0.26	99.46 $\pm$ 1.05
200 nmol/L TAK-242	98.75 $\pm$ 2.15	99.79 $\pm$ 2.66	96.31 $\pm$ 2.65
1 000 nmol/L TAK-242	98.02 $\pm$ 1.67	97.22 $\pm$ 2.64	98.14 $\pm$ 1.28

表3 不同浓度 TAK-242 对 APAP 组细胞活力的影响/%  
Table 3 Effect of different concentrations of TAK-242 on cell viability in the APAP group /%

组别	1 h	4 h	12 h
5 mmol/L APAP	91.61±0.54	84.63±1.98	91.67±0.33
5 mmol/L APAP+10 nmol/L TAK-242	97.36±0.73 <sup>*</sup>	97.32±1.57 <sup>*</sup>	88.76±4.81
5 mmol/L APAP+50 nmol/L TAK-242	97.91±0.60 <sup>*</sup>	96.57±1.89 <sup>*</sup>	100.90±3.26 <sup>*</sup>
5 mmol/L APAP+100 nmol/L TAK-242	101.90±3.44 <sup>*</sup>	102.10±6.81 <sup>*</sup>	100.30±2.08 <sup>*</sup>
5 mmol/L APAP+200 nmol/L TAK-242	96.98±1.34 <sup>*</sup>	101.60±9.38 <sup>*</sup>	100.40±2.48 <sup>*</sup>
5 mmol/L APAP+1 000 nmol/L TAK-242	91.08±0.51	85.69±0.40	91.41±1.27

\*  $P < 0.05$  vs 同一时间点 APAP 组。

### 2.3 APAP 上调 L-02 细胞的 TLR4 mRNA 表达量

通过 RT-qPCR 法检测 TLR4 mRNA 表达量。与对照组比较,1、4、12 h APAP 组中 TLR4 mRNA 水平均上调( $P$  均 $<0.05$ );与 1、4、12 h APAP 组比较,同一时间点 APAP+TAK-242 组中 TLR4 mRNA 水平均下调( $P$  均 $<0.05/3=0.0167$ )。见表 4。

### 2.4 抑制 TLR4 通过下调 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路来减轻 APAP 诱导的炎症反应

为了进一步探讨抑制 TLR4 如何减轻 APAP 诱

导的肝损伤,通过 RT-qPCR 检测各组 NF- $\kappa$ B、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和 IL-6 mRNA 表达量。与对照组比较,1、4、12 h APAP 组 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达量均上调( $P$  均 $<0.05$ );与 APAP 组比较,同一时间点 APAP+TAK-242 组 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达量均下调( $P$  均 $<0.05/3=0.0167$ )。结果提示抑制 TLR4 可以通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路来减轻炎症反应。见表 4。

表4 APAP 对各组肝细胞中 TLR4、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-6、SLC7A11、GPX4 mRNA 表达的影响

Table 4 The effects of APAP on the expression of TLR4, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6, SLC7A11 and GPX4 mRNA in hepatocytes of each group

各指标 mRNA	对照 组	1 h		4 h		12 h	
		APAP 组	APAP+TAK-242 组	APAP 组	APAP+TAK-242 组	APAP 组	APAP+TAK-242 组
TLR4	1.00	1.34±0.04 <sup>*</sup>	1.09±0.08 <sup>#</sup>	1.92±0.24 <sup>*</sup>	0.44±0.05 <sup>#</sup>	1.87±0.04 <sup>*</sup>	0.77±0.37 <sup>#</sup>
NF- $\kappa$ B	1.00	1.68±0.03 <sup>*</sup>	1.23±0.10 <sup>#</sup>	2.09±0.04 <sup>*</sup>	1.07±0.08 <sup>#</sup>	1.35±0.03 <sup>*</sup>	0.76±0.03 <sup>#</sup>
TNF- $\alpha$	1.00	5.42±0.35 <sup>*</sup>	1.74±0.23 <sup>#</sup>	10.23±2.30 <sup>*</sup>	3.68±1.16 <sup>#</sup>	12.41±2.57 <sup>*</sup>	4.08±0.65 <sup>#</sup>
IL-6	1.00	1.95±0.53 <sup>*</sup>	0.97±0.14 <sup>#</sup>	3.53±0.49 <sup>*</sup>	1.22±0.17 <sup>#</sup>	1.70±0.08 <sup>*</sup>	1.09±0.27 <sup>#</sup>
SLC7A11	1.00	0.71±0.09 <sup>*</sup>	1.16±0.21 <sup>#</sup>	0.52±0.08 <sup>*</sup>	0.80±0.06 <sup>#</sup>	0.57±0.02 <sup>*</sup>	1.51±0.06 <sup>#</sup>
GPX4	1.00	0.71±0.07 <sup>*</sup>	1.11±0.08 <sup>#</sup>	0.65±0.11 <sup>*</sup>	1.29±0.16 <sup>#</sup>	0.85±0.03 <sup>*</sup>	1.20±0.09 <sup>#</sup>

\*  $P < 0.05$  vs 对照组, #  $P < 0.05/3=0.0167$  vs 同一时间 APAP 组。

### 2.5 TAK-242 预处理可能减轻 APAP 诱导的早期肝损伤

为进一步研究 TLR4 是否参与 APAP 早期肝损伤,在 APAP 给药前用 TAK-242 预处理 2 h。与对照组比较,1、4、12 h APAP 组细胞活力明显下降( $P$  均 $<0.05$ );而较 APAP 组,同一时间点 APAP+TAK-242 组的细胞活力均上升( $P$  均 $<0.05/3=$

0.0167)。与对照组比较,1、4、12 h APAP 组的 ALT、AST 水平均升高( $P$  均 $<0.05$ );与 APAP 组比较,同一时间点 APAP+TAK-242 组的 ALT、AST 水平均降低( $P$  均 $<0.05/3=0.0167$ )。提示抑制 TLR4 可能在 APAP 诱导的早期肝损伤阶段起到保护作用。见表 5。

表5 APAP 对各组肝细胞中细胞活力、AST 和 ALT 水平的影响/%

Table 5 Effect of APAP on cell viability, AST and ALT levels in hepatocytes of each group/%

指标	对照 组	1 h		4 h		12 h	
		APAP 组	APAP+TAK-242 组	APAP 组	APAP+TAK-242 组	APAP 组	APAP+TAK-242 组
细胞活力/%	100.00	91.61±0.54 <sup>*</sup>	101.90±3.44 <sup>#</sup>	84.63±1.98 <sup>*</sup>	102.10±6.81 <sup>#</sup>	91.67±0.33 <sup>*</sup>	100.30±2.08 <sup>#</sup>
AST/(U/L)	4.73±0.96	21.51±1.95 <sup>*</sup>	15.69±1.32 <sup>#</sup>	29.03±1.77 <sup>*</sup>	13.62±1.67 <sup>#</sup>	41.28±1.14 <sup>*</sup>	36.48±0.84 <sup>#</sup>
ALT/(U/L)	1.96±0.31	2.81±0.05 <sup>*</sup>	0.75±0.19 <sup>#</sup>	6.24±0.61 <sup>*</sup>	0.76±0.10 <sup>#</sup>	6.47±0.16 <sup>*</sup>	5.37±0.10 <sup>#</sup>

\*  $P < 0.05$  vs 对照组; #  $P < 0.05/3=0.0167$  vs 同一时间 APAP 组。

### 2.6 抑制 TLR4 可减少 APAP 诱导的程序性坏死

为了研究 TLR4 是否在 APAP 肝损伤中参与调

控程序性坏死,本实验检测了程序性坏死相关蛋白水平包括 HMGB1、RIP1、RIP3。与对照组比较,1、

4、12 h APAP 组 HMGB1、RIP1、RIP3 蛋白水平均增高( $P$  均 $<0.05$ );与 APAP 组比较,同一时间点

APAP+TAK-242 组 HMGB1、RIP1、RIP3 蛋白水平均降低( $P$  均 $<0.05/3=0.0167$ )。见表 6、图 1。

表 6 各组肝细胞中 HMGB1、RIP1、RIP3、P53、NF- $\kappa$ B、SLC7A11 和 GPX4 蛋白相对表达量以及亚铁离子含量( $\text{nmol}/10^6$ )

Table 6 The relative protein expressions of HMGB1, RIP1, RIP3, P53, NF- $\kappa$ B, SLC7A11 and GPX4, and the Fe $^{2+}$  content ( $\text{nmol}/10^6$ ) in hepatocytes of each group

指标	对照组	1 h		4 h		12 h	
		APAP 组	APAP+TAK-242 组	APAP 组	APAP+TAK-242 组	APAP 组	APAP+TAK-242 组
HMGB1 蛋白	0.43 $\pm$ 0.14	0.87 $\pm$ 0.23 <sup>*</sup>	0.44 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>	1.27 $\pm$ 0.27 <sup>*</sup>	0.51 $\pm$ 0.21 <sup>#</sup>	0.84 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	0.41 $\pm$ 0.14 <sup>#</sup>
RIP1 蛋白	0.63 $\pm$ 0.08	0.98 $\pm$ 0.07 <sup>*</sup>	0.53 $\pm$ 0.10 <sup>#</sup>	1.25 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	0.69 $\pm$ 0.13 <sup>#</sup>	0.89 $\pm$ 0.08 <sup>*</sup>	0.60 $\pm$ 0.09 <sup>#</sup>
RIP3 蛋白	0.57 $\pm$ 0.10	1.22 $\pm$ 0.10 <sup>*</sup>	0.81 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	1.34 $\pm$ 0.20 <sup>*</sup>	0.71 $\pm$ 0.05 <sup>#</sup>	1.28 $\pm$ 0.10 <sup>*</sup>	0.56 $\pm$ 0.27 <sup>#</sup>
P53 蛋白	0.64 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>	0.56 $\pm$ 0.11 <sup>#</sup>	1.24 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	0.67 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>	0.83 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	0.30 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>
NF- $\kappa$ B 蛋白	0.55 $\pm$ 0.08	1.22 $\pm$ 0.20 <sup>*</sup>	0.75 $\pm$ 0.15 <sup>#</sup>	1.24 $\pm$ 0.18 <sup>*</sup>	0.65 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	1.20 $\pm$ 0.20 <sup>*</sup>	0.50 $\pm$ 0.10 <sup>#</sup>
SLC7A11 蛋白	1.09 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.10 <sup>*</sup>	0.91 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>	0.55 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	1.04 $\pm$ 0.15 <sup>#</sup>	0.67 $\pm$ 0.07 <sup>*</sup>	1.15 $\pm$ 0.13 <sup>#</sup>
GPX4 蛋白	1.23 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	1.00 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>	0.58 $\pm$ 0.07 <sup>*</sup>	0.98 $\pm$ 0.12 <sup>#</sup>	0.58 $\pm$ 0.17 <sup>*</sup>	1.07 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>
Fe $^{2+}$ 含量	0.35 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.04 <sup>*</sup>	0.40 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	0.71 $\pm$ 0.01 <sup>*</sup>	0.54 $\pm$ 0.05 <sup>#</sup>	0.57 $\pm$ 0.02 <sup>*</sup>	0.50 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>

\*  $P<0.05$  vs 对照组; #  $P<0.05/3=0.0167$  vs 同一时间 APAP 组。

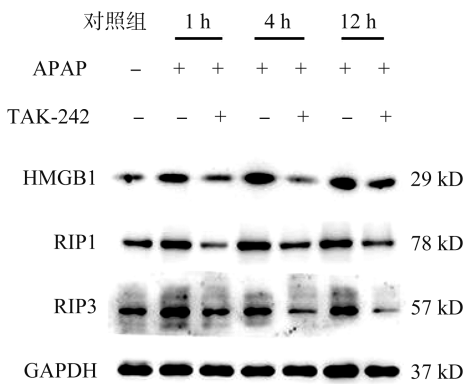


图 1 各组肝细胞中 HMGB1、RIP1 及 RIP3 蛋白的表达  
Figure 1 The protein expressions of HMGB1, RIP1 and RIP3 in hepatocytes of each group

## 2.7 抑制 TLR4 通过下调 NF- $\kappa$ B/P53 信号通路减少 APAP 诱导肝细胞铁死亡

本实验通过 Fe $^{2+}$  试剂盒检测各组细胞 Fe $^{2+}$  含量,通过 Western blotting 检测各组 NF- $\kappa$ B、P53 以及铁死亡相关蛋白(SLC7A11、GPX4)水平,通过 RT-qPCR 技术检测各组 SLC7A11 和 GPX4 mRNA 表达量。与对照组比较,1、4、12 h APAP 组的 Fe $^{2+}$  含量均升高( $P$  均 $<0.05$ ),NF- $\kappa$ B 和 P53 蛋白水平均增高( $P$  均 $<0.05$ ),并且 SLC7A11 和 GPX4 蛋白水平和 mRNA 表达量均下调( $P$  均 $<0.05$ );与 APAP 组比较,同一时间点 APAP+TAK-242 组的 Fe $^{2+}$  含量均降低( $P$  均 $<0.05/3=0.0167$ ),NF- $\kappa$ B 和 P53 蛋白水平降低( $P$  均 $<0.05/3=0.0167$ ),以及 SLC7A11 和 GPX4 蛋白水平和 mRNA 表达量均上调( $P$  均 $<0.05/3=0.0167$ )。见表 4、表 6 和图 2。

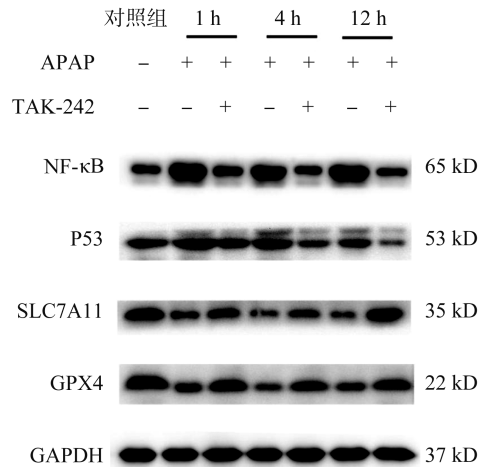


图 2 各组肝细胞中 NF- $\kappa$ B、P53、SLC7A11 及 GPX4 蛋白的表达  
Figure 2 The protein expressions of NF- $\kappa$ B, P53, SLC7A11 and GPX4 in hepatocytes of each group

## 3 讨论

APAP 是全球最常用的镇痛和解热药物之一。在推荐剂量范围内是安全有效的,而过量可引起肝损伤和急性肝衰竭等。因此,我们在体外构建了 APAP 诱导的早期肝损伤模型,通过 TAK-242 预处理,旨在初步探讨抑制 TLR4 是否影响 APAP 诱导的早期肝损伤及其可能的作用机制,为 APAP 早期肝损伤的临床治疗提供新的方向。

本研究结果显示,APAP 处理后肝细胞 TLR4 mRNA 水平上调,这表明 TLR4 的确参与 APAP 诱导的急性肝损伤过程。在临床中 ALT 和 AST 已被公认为肝损伤的生化标志物。我们观察到 APAP 上

调了肝细胞 ALT 和 AST 水平并且下调了细胞活力;而通过 TAK-242 预处理后,本研究结果显示,ALT、AST 水平明显下调,并且上调了细胞活力。这些结果表明抑制 TLR4 可以减轻 APAP 诱导的早期肝损伤。

于是,我们进一步探讨了抑制 TLR4 后,下游有哪些信号通路参与减轻 APAP 诱导的早期肝损伤过程。炎症反应被认为是 APAP 诱导肝损伤的基本机制之一<sup>[17]</sup>。而 NF- $\kappa$ B 是位于 TLR4 下游的转录因子,它的激活可以触发一系列炎症因子风暴,如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等<sup>[18]</sup>。有研究发现,在脓毒症诱导大鼠肝损伤的模型中,TLR4/NF- $\kappa$ B 途径的抑制可减轻炎症反应,从而减轻肝损伤<sup>[19]</sup>;在急性心肌梗死大鼠模型中,异槲皮素可通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路,从而促进心肌梗死的恢复<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,APAP 上调了肝细胞中炎症相关因子 NF- $\kappa$ B、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达,而 TAK-242 的预处理下调了肝细胞中炎症相关因子 NF- $\kappa$ B、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达。因此,我们推测抑制 TLR4 可能通过抑制下游 NF- $\kappa$ B 信号通路来下调炎症因子的表达,从而减轻 APAP 早期肝损伤。

细胞死亡是药物性肝损害 (drug-induced liver injury, DILI) 的重要特征,是不同药物引起 DILI 的共同“终点”事件<sup>[21]</sup>。而程序性坏死和铁死亡作为细胞死亡的两种方式,在肝脏疾病中也发挥着重要作用。HMGB1 是一种源自细胞核并在坏死过程中释放的损伤相关分子模式<sup>[22]</sup>。而 HMGB1 可通过与不同受体 (TLR2 和 TLR4) 相互作用而具有细胞信号传导功能<sup>[23]</sup>。有研究表明,TLR4 拮抗剂通过抑制 TLR4/HMGB1 通路来减轻缺血再灌注肝损伤<sup>[24]</sup>。而程序性坏死是一种由 RIP1/RIP3 介导的受调控的程序性细胞死亡方式<sup>[25]</sup>。有研究表明,抑制 TLR4 通过减少程序性坏死减轻大鼠高脂肪饮食引起的胰腺炎<sup>[11]</sup>;也有研究表明 RIP3 的缺失可以改善 Con-A 诱导的自身免疫性肝炎<sup>[12]</sup>。然而抑制 TLR4 是否通过 HMGB1 影响 APAP 诱导的程序性坏死尚不清楚。于是本实验检测了各组别 HMGB1、RIP1、RIP3 蛋白水平,发现 APAP 上调了肝细胞的 HMGB1 蛋白水平及程序性坏死相关指标 RIP1、RIP3 的蛋白水平,进一步分析发现 TAK-242 的预处理可下调肝细胞的 HMGB1 蛋白水平及程序性坏死相关蛋白水平。上述结果表明,APAP 可以诱导肝细胞发生程序性坏死,并且抑制 TLR4 可能通过 HMGB1 途径下调程序性坏死,从而减轻 APAP 早期肝损伤。

铁死亡是一种新发现的铁依赖性程序性细胞死

亡类型<sup>[26]</sup>。细胞内上调的游离 Fe<sup>2+</sup> 可以通过 Fenton 反应直接产生过量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS),从而促进脂质过氧化,诱导细胞铁死亡<sup>[27]</sup>。而 SLC7A11/GPX4 途径可有效去除 ROS 并抑制脂质过氧化<sup>[28]</sup>。有研究表明,NF- $\kappa$ B 介导的 P53 作用于 SLC7A11,抑制 SLC7A11/GPX4 的表达上调<sup>[14]</sup>,从而诱导铁死亡。部分研究表明,抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B/P53 信号通路可以减少铁死亡,从而减轻心肌损伤<sup>[15]</sup>;通过抑制 TLR4 信号减少铁死亡来减轻肾脏缺血再灌注损伤<sup>[29]</sup>。那么在 APAP 诱导的早期肝损伤中,抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B/P53 是否可以通过减少肝细胞的铁死亡来减轻肝损伤? 本研究结果显示,APAP 上调了肝细胞内 Fe<sup>2+</sup> 含量,并且下调了肝细胞中的 SLC7A11 和 GPX4 蛋白水平和 mRNA 表达。这表明 APAP 可能通过下调 SLC7A11/GPX4 途径来诱导肝细胞的铁死亡。进一步分析发现,通过 TAK-242 的预处理,下调了肝细胞内 Fe<sup>2+</sup> 含量及 NF- $\kappa$ B 和 P53 蛋白水平,而 SLC7A11 和 GPX4 蛋白和 mRNA 水平均上调,抑制了肝细胞铁死亡。上述结果表明,抑制 TLR4 可能通过 TLR4/NF- $\kappa$ B/P53 信号通路减轻肝细胞铁死亡,从而改善 APAP 诱导的早期肝损伤。

综上所述,本研究结果表明,APAP 可以诱导肝细胞发生程序性坏死和铁死亡。TLR4 被抑制后,一方面可能通过下调 TLR4/HMGB1 信号通路来减轻肝细胞程序性坏死;另一方面可能通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路来减少炎症反应和抑制铁死亡,最终改善 APAP 诱导的早期肝损伤,为 TLR4 及其下游程序性坏死和铁死亡信号通路抑制剂能否作为 APAP 急性肝损伤新的治疗靶点提供可能的理论依据。

## 参考文献:

- [1] Liao J, Lu Q, Li Z, et al. Acetaminophen-induced liver injury: molecular mechanism and treatments from natural products [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1122632. doi: 10.3389/fphar.2023.1122632.
- [2] Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen toxicity: novel insights into mechanisms and future perspectives [J]. *Gene Expr*, 2018, 18(1): 19-30.
- [3] Jaeschke H, Ramachandran A. Mechanisms and pathophysiological significance of sterile inflammation during acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 138: 111240. doi: 10.1016/j.fct.2020.111240.
- [4] Zhang P, Li LQ, Zhang D, et al. Over-expressed miR-

- 27a-3p inhibits inflammatory response to spinal cord injury by decreasing TLR4[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(17): 5416-5423.
- [5] Jovanovic SS, Martinovic V, Bogojevic D, et al. Modulation of diabetes-related liver injury by the HMGB1/TLR4 inflammatory pathway[J]. *J Physiol Biochem*, 2018, 74(2): 345-358.
- [6] Li S, Liu R, Xia S, et al. Protective role of curcumin on aflatoxin B1-induced TLR4/RIPK pathway mediated-necroptosis and inflammation in chicken liver[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 233: 113319. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113319.
- [7] Zhu K, Zhu X, Sun S, et al. Inhibition of TLR4 prevents hippocampal hypoxic-ischemic injury by regulating ferroptosis in neonatal rats[J]. *Exp Neurol*, 2021, 345: 113828. doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113828.
- [8] Satoh T, Akira S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins[J]. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(6): 10.
- [9] Chen SN, Tan Y, Xiao XC, et al. Deletion of TLR4 attenuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(10): 1610-1619.
- [10] Cao M, Chen F, Xie N, et al. c-Jun N-terminal kinases differentially regulate TNF- and TLRs-mediated necroptosis through their kinase-dependent and -independent activities[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1140.
- [11] Hong Y, Yu J, Su Y, et al. High-fat diet aggravates acute pancreatitis via TLR4-mediated necroptosis and inflammation in rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1-10. doi: 10.1155/2020/8172714.
- [12] Deutsch M, Graffeo CS, Rokosh R, et al. Divergent effects of RIP1 or RIP3 blockade in murine models of acute liver injury[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(5): e1759. doi: 10.1038/cddis.2015.126.
- [13] Chen J, Li X, Ge C, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease[J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(3): 467-480.
- [14] Lei G, Zhang Y, Hong T, et al. Ferroptosis as a mechanism to mediate p53 function in tumor radiosensitivity[J]. *Oncogene*, 2021, 40(20): 3533-3547.
- [15] Chen D, Geng Y, Deng Z, et al. Inhibition of TLR4 alleviates heat stroke-induced cardiomyocyte injury by down-regulating inflammation and ferroptosis[J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2297.
- [16] Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, et al. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules[J]. *Mol Pharmacol*, 2011, 79(1): 34-41.
- [17] Huang GJ, Deng JS, Huang SS, et al. Hepatoprotective effects of eburicoic acid and dehydroeburicoic acid from *Antrodia camphorata* in a mouse model of acute hepatic injury[J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 3020-3027.
- [18] Chen Y, Fang ZM, Yi X, et al. The interaction between ferroptosis and inflammatory signaling pathways[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(3): 205.
- [19] 李微微, 仇大鹏, 高琴, 等. 选择性激动黑皮质素 4 型受体(MC4R)通过 HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号途径对抗大鼠脓毒症致急性肝损伤[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(8): 1055-1059.
- LI Huihui, QIU Dapeng, GAO Qin, et al. Selectively activating melanocortin 4 receptor acts against rat sepsis-induced acute liver injury via HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Chinese Journal of cellular and Molecular Immunology*, 2016, 32(8): 1055-1059.
- [20] Ma C, Jiang Y, Zhang X, et al. Isoquercetin ameliorates myocardial infarction through anti-inflammation and anti-apoptosis factor and regulating TLR4-NF- $\kappa$ B signal pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6675-6680.
- [21] 朱英, 江振洲, 张陆勇. 药物性肝损伤的肝细胞死亡方式及治疗药物研究进展[J]. *药物评价研究*, 2021, 44(5): 1097-1104.
- ZHU Ying, JIANG Zhenzhou, ZHANG Luyong. Research advance of hepatocyte death and therapeutic drugs in drug-induced liver injury[J]. *Drug Evaluation Research*, 2021, 44(5): 1097-1104.
- [22] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation[J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 191-195.
- [23] Wang J, Li R, Peng Z, et al. HMGB1 participates in LPS-induced acute lung injury by activating the AIM2 inflammasome in macrophages and inducing polarization of M1 macrophages via TLR2, TLR4, and RAGE/NF- $\kappa$ B signaling pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(1): 61-80.
- [24] McDonald KA, Huang H, Tohme S, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonist eritoran tetrasodium attenuates liver ischemia and reperfusion injury through inhibition of high-mobility group box protein B1 (HMGB1) signaling[J]. *Mol Med*, 2015, 20(1): 639-648.
- [25] Zhang YF, He W, Zhang C, et al. Role of receptor interacting protein (RIP) 1 on apoptosis-inducing factor-mediated necroptosis during acetaminophen-evoked acute liver failure in mice[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 225(3): 445-453.