DOI:10.16016/j.2097-0927.202304057

牛磺石胆酸通过 TGR5 调节巨噬细胞极化改善肝细胞脂质沉积

马 琴[1,2],蒋林成[1,2],尤月华[2],倪洪彬[2],蔺晓菁[2],肖晓秋[2],李继斌[1] 400016 重庆,重庆医科大学:公共卫生学院营养与食品卫生学教研室[1],附属第一医院重大代谢性疾病转化医学重点实验室[2]

[摘要] **目的** 观察牛磺石胆酸(taurocholic acid, TLCA)调节棕榈酸(palmitic acid, PA)诱导的巨噬细胞极化,探讨其对肝细胞脂质代谢的影响。**方法** 分别采用 TLCA、PA 处理小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7),实验分为对照(CON)组、TLCA 组、PA 组和 PA+TLCA 组。24 h 后收集各组条件培养基(conditioned medium, CM),分别处理 C57 BL/6J 小鼠肝脏原代细胞和 AML-12 肝细胞;使用氨苯蝶啶(triamterene,Tr)抑制巨噬细胞武田 G 蛋白偶联受体 5(Takeda G-protein receptor 5,TGR5),以证实其在调节巨噬细胞极化以及降低肝细胞脂质沉积中的作用。采用 BODIPY 荧光染色检测肝细胞内脂质积聚;RT-qPCR 检测炎症因子及脂质代谢相关基因 mRNA 水平;蛋白质免疫印迹法检测巨噬细胞 TGR5 和肝细胞固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element-binding proteins,SREBP-1c)表达水平;细胞免疫荧光染色观察细胞内 iNOS、CD206 蛋白表达。**结果** BODIPY 荧光染色显示,PA 组较 CON 组肝细胞脂质沉积显著增多,PA+TLCA 组脂肪沉积得到缓解($P<0.05$);与 PA 组比较,PA+TLCA 组原代肝细胞和 AML-12 细胞脂质合成基因 ACC1、FASN、SREBP-1c 的 mRNA 水平以及 SREBP-1c 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),ACOX1 和 CPT1A 表达水平在各组间无显著变化;RT-qPCR 结果显示,PA 诱导巨噬细胞向 M1 型极化,促炎因子(iNOS、IL-6、IL-1β、TNF-α)水平显著升高,而联合 TLCA 处理后可降低炎症因子水平且增加 RAW264.7 细胞 M2 型极化相关基因(Arg1、IL-4、IL-10)mRNA 表达水平($P<0.05$);与 CON 组比较,PA 组 M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 显著增加,M2 型巨噬细胞标志物 CD206 明显降低;TLCA 可促进 TGR5 蛋白表达($P=0.071\ 4$),氨苯蝶啶抑制 TGR5 后,显著抑制 TLCA 调节巨噬细胞极化和减少肝细胞脂质沉积的作用。**结论** TLCA 通过巨噬细胞 TGR5 抑制 PA 诱导的 M1 型极化且促进 M2 型极化,促炎症因子减少,进而降低肝细胞脂质合成,改善肝细胞脂质沉积。

[关键词] 巨噬细胞极化;牛磺石胆酸;非酒精性脂肪性肝病;武田 G 蛋白偶联受体 5

[中图法分类号] R575.5; R967; R977.9 [文献标志码] A

Taurocholic acid improves hepatocyte lipid deposition by regulating macrophage polarization through TGR5

MA Qin[1,2],JIANG Lincheng[1,2],YOU Yuehua[2],NI Hongbing[2],LIN Xiaojing[2],XIAO Xiaoqiu[2],LI Jibin[1] [1]Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016;[2]Chongqing Key Laboratory of Translational Medicine in Major Metabolic Diseases,the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,Chongqing,400016,China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of taurocholic acid (TLCA) regulating palmitic acid (PA)-induced macrophage polarization on hepatocyte lipid metabolism. **Methods** Mouse mononuclear macrophage (RAW264.7) cells, treated with TLCA and PA, were divided into control (CON), TLCA, PA and PA+TLCA groups. The conditioned medium (CM) was collected for culturing primary hepatocytes from

[通信作者] 李继斌,E-mail:100091@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

C57 BL/6J and AML-12 liver cells. Triamterene was used to inhibit macrophage Takeda G-protein receptor 5 (TGR5), which could investigate the role of TGR5 in regulating macrophage polarization and reducing lipid deposition in hepatocytes. BODIPY fluorescence staining was performed to detect lipid accumulation in hepatocytes; The mRNA levels of genes related to inflammatory factors and lipid metabolism were detected by RT-qPCR; Western blotting was performed to detect the level of protein expression of macrophage TGR5 and hepatic cell SREBP-1c. The expression of iNOS and CD206 were observed by immunofluorescence staining. **Results** BODIPY fluorescence staining showed that PA group displayed significantly increased lipid accumulation, compared with CON group, while TLCA treatment could reduce the PA-induced lipid accumulation($P<0.05$); Compared with the PA group, the PA+TLCA group had decreased mRNA levels of ACC1, FASN and SREBP-1c and protein expression of SREBP-1c ($P<0.05$). However, there were no significant changes of expression of ACOX1 and CPT1A among these groups mentioned above. The outcome of RT-qPCR showed that PA stimulated RAW264.7 into M1-type polarization and significantly increased the levels of proinflammatory factors (iNOS, IL-6, IL-1β, TNF-α). PA combined with TLCA could reduce the levels of inflammatory factors and increased the mRNA expression levels of M2-type polarization-related genes, Arg1, IL-4 and IL-10 ($P<0.05$). Compared with CON group, the PA group showed increased M1-type marker iNOS and decreased M2-type marker CD206, while TLCA could promote the protein expression of TGR5($P=0.0714$). TGR5 inhibited by triamterene could suppress macrophage polarization regulated by TLCA and reduce hepatocyte lipid accumulation. **Conclusion** TLCA inhibits PA-induced M1-type polarization and promotes M2-type polarization *via* TGR5, which reduces proinflammatory factors, reduces hepatic lipogenesis and promotes hepatocyte lipid accumulation.

[**Key words**] macrophages polarization; taurocholic acid; non-alcoholic fatty liver disease; Takeda G protein-coupled receptor 5

Corresponding author: LI Jibin, E-mail: 100091@cqmu.edu.cn

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)是指在没有其他明确原因(如过量饮酒)的情况下发生的一系列肝脏代谢性疾病,全球患病率约为29.8%,且呈持续上升趋势,我国成人的NAFLD患病率也高达29.2%。目前,NAFLD已经成为与肥胖大流行并行的全球性公共卫生问题,其疾病表现对社会经济造成负担[1-3]。肝脏含有体内最大的常驻巨噬细胞群,巨噬细胞可分为促炎性巨噬细胞(M1表型)和抗炎性巨噬细胞(M2表型)[4]。M1表型巨噬细胞可释放促炎细胞因子,如TNF-α、IL-1β和趋化因子等引起脂肪变性(包括肝细胞脂质沉积增加、脂肪炎症和肿胀增加),而M2型巨噬细胞因子,如IL-10,能发挥抗炎作用,维持肝脏免疫稳态[5]。炎症反应和脂质代谢紊乱相关的肝脏脂质沉积是NAFLD进展中的2个关键环节,当巨噬细胞促炎活化时,可增加肝细胞脂肪沉积[6],因此,抑制巨噬细胞炎症对NAFLD的发生发展有着重要作用。

胆汁酸作为一种重要的信号分子,参与调节肝脏稳态。牛磺石胆酸(taurocholic acid,TLCA)是最初在牛胆汁和牛胆结石中发现,是初级胆汁酸鹅脱氧胆酸衍生而来的一种次级胆汁酸,在人类胆汁中也有发现[7],具有抑制炎症的作用。武田G蛋白偶联受体5(Takeda G-protein receptor 5,TGR5)也称作G-蛋白偶联胆汁酸受体1(G protein-coupled bile acid receptor 1,GPBAR1),是一种胆汁酸膜受体,来源于G-蛋白偶联受体家族,主要定位于肝脏巨噬细胞中[8-9],当巨噬细胞中TGR5激活时,可调控巨噬细胞M1/M2型极化,改善肝脏脂肪变性[10],抑制NAFLD的发生发展。在肝实质细胞中,TGR5调节小鼠全身糖耐量水平,但是对体质量、肝脏脂肪沉积并无影响,且TGR5特异性激动剂化合物18对肝细胞脂质代谢无直接改善作用[11]。前期研究报道了TLCA抑制脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的巨噬细胞M1型极化和炎症因子水平是通过激活TGR5实现的[12],但是TLCA是否可以调控巨噬细胞极化进而改善肝细胞脂质代谢及TGR5是否参与这一过程还尚不清楚。本研究利用棕榈酸(palmitic acid, PA)诱导的巨噬细胞炎症模型,观察TLCA对巨噬细胞极化的调控作用,研究其对肝细胞脂肪变性的影响,并探讨其可能的作用机制,为NAFLD的发生发展提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HEPES、ITS 细胞添加剂和 PA 购自美国 Sigma 公司;TLCA 购自美国 MCE 公司;BODIPY 荧光染料购自上海懋康生物;引物、Ⅳ型胶原酶购自上海生工生物技术有限公司;TRIzol、反转录试剂盒、SYBR 购自宝日医生物技术(北京)有限公司;GAPDH 一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司,TGR5、iNOS 抗体购自美国 Abcam 公司,SREBP-1c 和 CD206 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;辣根素过氧化物酶标记二抗购自武汉博士德生物工程有限公司;DAPI、RIPA、BCA 蛋白检测试剂盒购自上海碧云天生物科技公司。

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7 细胞培养与处理 RAW264.7 细胞购自中国科学院细胞库,使用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基培养;细胞融合度达到 80%~90%时使用胰酶消化传代、种板,TLCA(30 μmol/L)、PA(200 μmol/L)和氨苯蝶啶(triamterene,Tr;10 μmol/L)单独(TLCA 组、PA 组、Tr 组)或者联合(PA+TLCA 组、PA+TLCA+Tr 组)处理 RAW264.7 细胞 24 h,以未处理细胞作为对照组(CON)。收集细胞上清液,0.22 μm 过滤器过滤后得到相应的条件培养液 CM,RAW264.7 细胞收集待测。细胞均在 37 ℃,5%CO_2 的恒温孵箱中培养。

1.2.2 原代肝细胞提取、培养及处理 8 只健康雄性 8 周龄 C57BL/6J 小鼠使用异氟烷麻醉后,打开腹腔,头皮针穿刺并固定肝门静脉;剪断下腔静脉,使用试剂 1(PBS+0.5 mmol/L HEPES+0.1 mmol/L EDTA+1%青霉素-链霉素)进行灌注洗净肝脏,随后使用试剂 2(HBSS+25 mmol/L HEPES+1% BSA+0.5% Ⅳ型胶原酶)灌注消化肝脏,待肝脏消化至松软呈乳黄色时,取出剪碎,获得组织-细胞悬液,悬液经 1 000 目细胞滤网过滤后进行梯度离心获得原代肝细胞,取适量细胞接种于 24 孔板、6 孔板中。使用含 5% FBS、1%青霉素-链霉素、2 mmol/mL 谷氨酰胺、100 nmol/mL 胰岛素、100 nmol/L 地塞米松的 Williams E 培养基。用各组 RAW264.7 细胞孵育 24 h 后得到的 CM 与原代肝细胞培养基 1∶1混合,孵育原代肝细胞 24 h,弃去培养液,收集细胞待测。

1.2.3 AML-12 细胞培养及处理 小鼠正常肝细胞 AML-12 购自中国科学院细胞库,使用含 10% FBS、1%青霉素-链霉素、1% ITS 和地塞米松 100 nmol/L 的 DMEM/F-12 培养基;用各组 RAW264.7 细胞孵育 24 h 后得到的 CM 与 AML-12 细胞培养基 1∶1混合,孵育 AML-12 细胞 24 h,弃去培养液,收集细胞待测。

1.2.4 BODIPY 荧光染色 原代肝细胞和小鼠 AML-12 细胞条件培养 24 h,分为 4 组:对照组、TLCA 组、PA 组、PA+TLCA 组。PBS 洗细胞 3 次,4%多聚甲醛固定细胞 20 min,BODIPY 中性脂滴荧光染料用 PBS 稀释(1∶1 000)后染细胞 20 min,用 PBS 清洗 3 次,DAPI 染细胞核,洗净后使用正置显微镜进行观察拍照。

1.2.5 RT-qPCR 检测相关基因的表达 RAW264.7 细胞和肝细胞处理 24 h 后,用 TRIzol 提取细胞 RNA,逆转录合成 cDNA,检测巨噬细胞 M1/M2 型极化以及肝细胞脂质合成、分解代谢相关基因 mRNA 表达水平,引物序列见表 1。反应条件为 95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,重复 40 个循环。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,$2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算目的基因的 mRNA 相对表达量。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
GAPDH	上游:AGGTCGGTGTGAACGGATTTG 下游:TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
IL-6	上游:ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG 下游:CATTGGAAATTGGGGTAGGA
TNF-α	上游:GTCTACTGAACTTCGGGGTGAT 下游:ATGATCTGAGTGTGAGGGTCTG
IL-4	上游:CTTCCAAGGTGCTTCGCATA 下游:GATGAATCCAGGCATCGAAA
IL-1β	上游:GAAATGCCACCTTTTGACAGTG 下游:TGGATGCTCTCATCAGGACAG
IL-10	上游:ATTTGAATTCCCTGGGTGAGAAG 下游:CACAGGGAGAAATCGATGACA
Arg1	上游:CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG 下游:AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
iNOS	上游:CAAGAGTTTGACCAGAGGACC 下游:TGGAACCACTCGTACTTGGGA
ACC1	上游:GTGCTGGGACTGTGGAATAC 下游:AGATTGACATCAGCCACCAT
SREBP-1c	上游:ACAGCAACCAGAAGCTCAAG 下游:TGCCCTCCATAGACACATCT
FASN	上游:TTGGGTGCTGACTACAACCT 下游:TGGATGATGTTGATGATGGA
ACOX1	上游:AACAGCCCAACTGTGACTTC 下游:ACAAAGGCATGTAACCCGTA
CPT1A	上游:CTTCCCATTTGACACCTTTG 下游:ATACGTGAGGCAGAACTTGC

1.2.6 细胞免疫荧光染色 RAW264.7 细胞处理 24 h,PBS 清洗细胞 3 次,加入 4%多聚甲醇固定细胞,0.5% Triton X-100 室温对细胞进行破膜处理,山羊血清封闭,加入一抗 iNOS、CD206 孵育巨噬细胞,4 ℃过夜后加入荧光二抗,脱水,封片,使用共聚焦显微镜进

行观察拍照。

1.2.7　蛋白质免疫印迹法　　RAPI 裂解细胞提取细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度后进行蛋白质免疫印迹分析。取适量蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰氨凝胶电泳(SDS-PAGE),湿电转至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温摇床封闭 1.5 h,孵育 TGR5 和 SREBP-1c 抗体过夜,4 ℃,第 2 天洗膜后使用 ECL 化学发光法进行显影,Image J 软件计算目的蛋白的表达量。

1.3　统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析和 Student's t 检验。$P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　TLCA 对 PA 诱导的巨噬细胞 M1/M2 型极化的影响

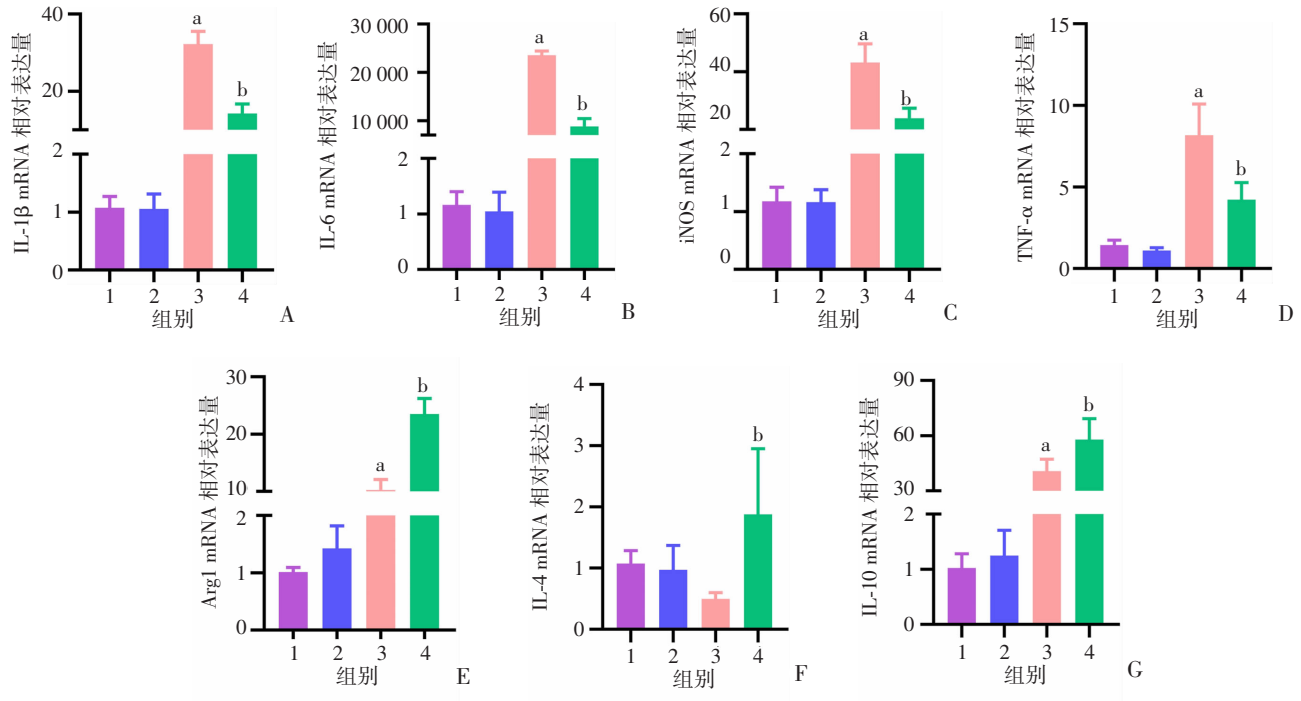
巨噬细胞在 PA、TLCA 联合或单独处理 24 h 后,RT-qPCR 结果显示,与对照组比较,PA 显著上调巨噬细胞炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β、iNOS 的 mRNA 水平($P<0.05$),联合 TLCA 则可以显著抑制 PA 诱导的巨噬细胞炎症(图 1A~D),增加抗炎因子 Arg1、IL-4、IL-10 的 mRNA 表达($P<0.05$,图 1E~G)。细胞免疫荧光结果显示,与对照组比较,PA 处理组巨噬细胞 M1 型标志物 iNOS 表达量显著增加,而 M2 型标志物 CD206 的表达降低,联合 TLCA 处理则 iNOS 的表达降低,促进巨噬细胞 M2 型极化(图 2)。结果表明 PA 诱导巨噬细胞炎症 M1 型极化,增加炎症因子的表达,而 TLCA 联合处理后可以逆转这种效应。

2.2　PA 诱导巨噬细胞极化对肝细胞脂质沉积的影响

BODIPY 荧光染色结果显示,与 CON 组比较,PA 组明显增加原代肝细胞中的脂质含量,PA+TLCA 组脂质沉积则无明显增加(图 3A),小鼠正常肝细胞 AML-12 结果一致(图 3B)。

2.3　巨噬细胞 M1/M2 极化对肝细胞脂质代谢的影响

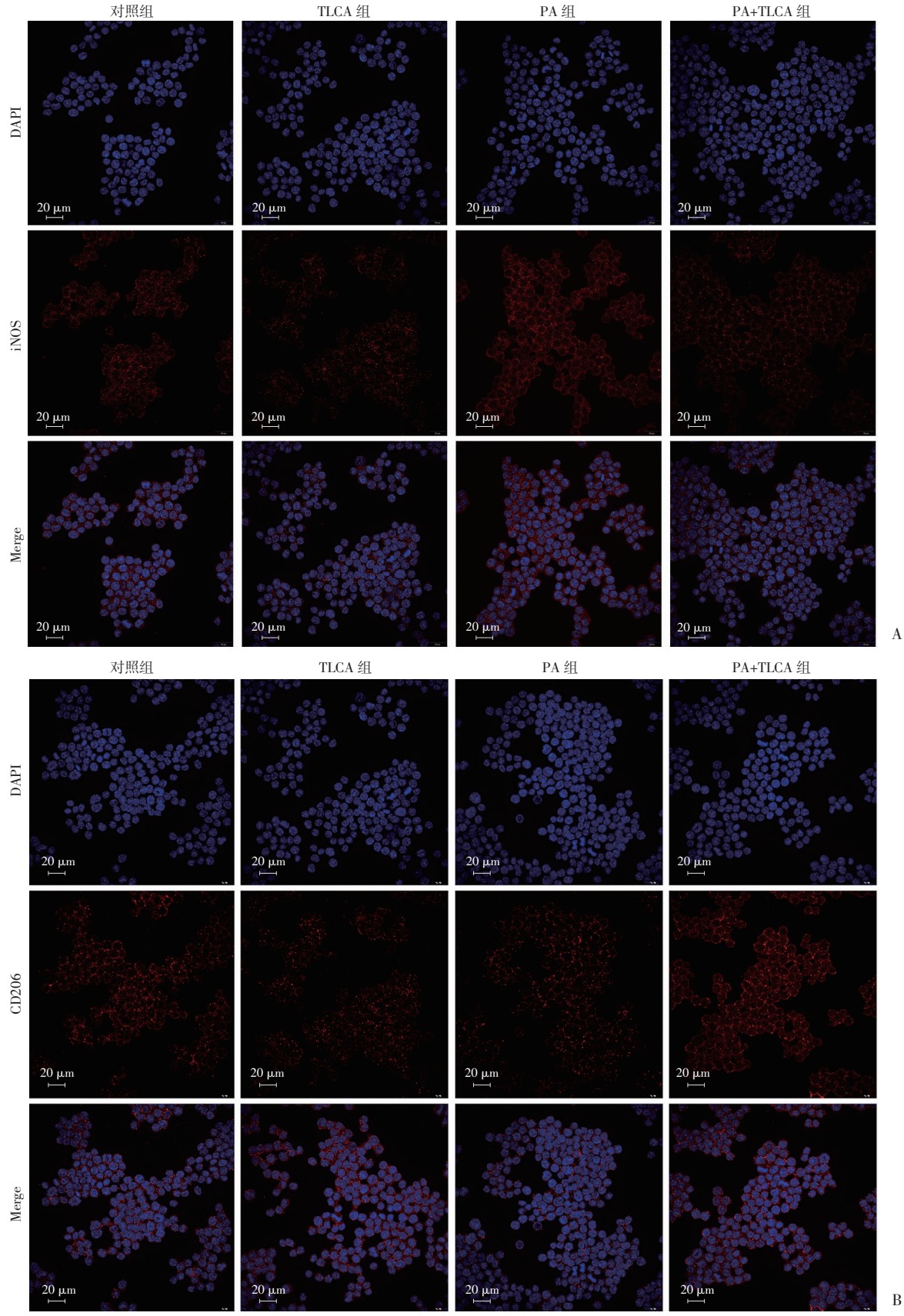
RT-qPCR 结果显示,与对照组比较,PA 组原代肝细胞脂质合成基因 SREBP-1c、ACC1、FASN 的 mRNA 表达水平升高($P<0.05$),PA+TLCA 组脂质合成基因表达较 PA 组降低($P<0.05$,图 4A),脂肪酸氧化基因 ACOX1 和 CPT1A 无显著差异(图 4A)。相同条件处理的 AML-12 细胞,与对照组比较,PA 组脂质合成基因 SREBP-1c 以及下游 2 个关键酶 FASN 和 ACC1 的 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$),并且脂质氧化基因 ACOX1 显著降低($P<0.05$),CPT1A 变化差异无统计学意义。与 PA 组比较,PA+TLCA 组脂质合成基因表达显著降低($P<0.05$,图 4B)。Western blot 结果显示,与 PA 组比较,PA+TLCA 组 SREBP-1c 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$,图 4C、D)。



1:对照组;2:TLCA 组;3:PA 组;4:PA+TLCA 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较

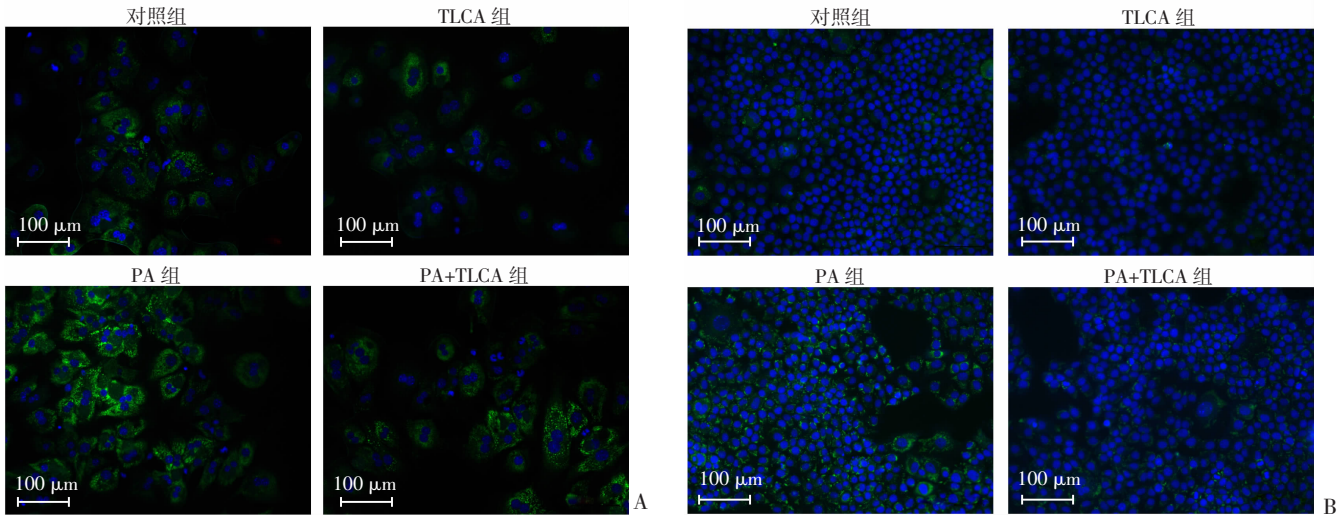
A~D:巨噬细胞促炎因子 mRNA 水平;E~G:巨噬细胞抗炎因子 mRNA 水平

图 1　TLCA 对 PA 诱导的巨噬细胞炎症因子的影响($n=5$)



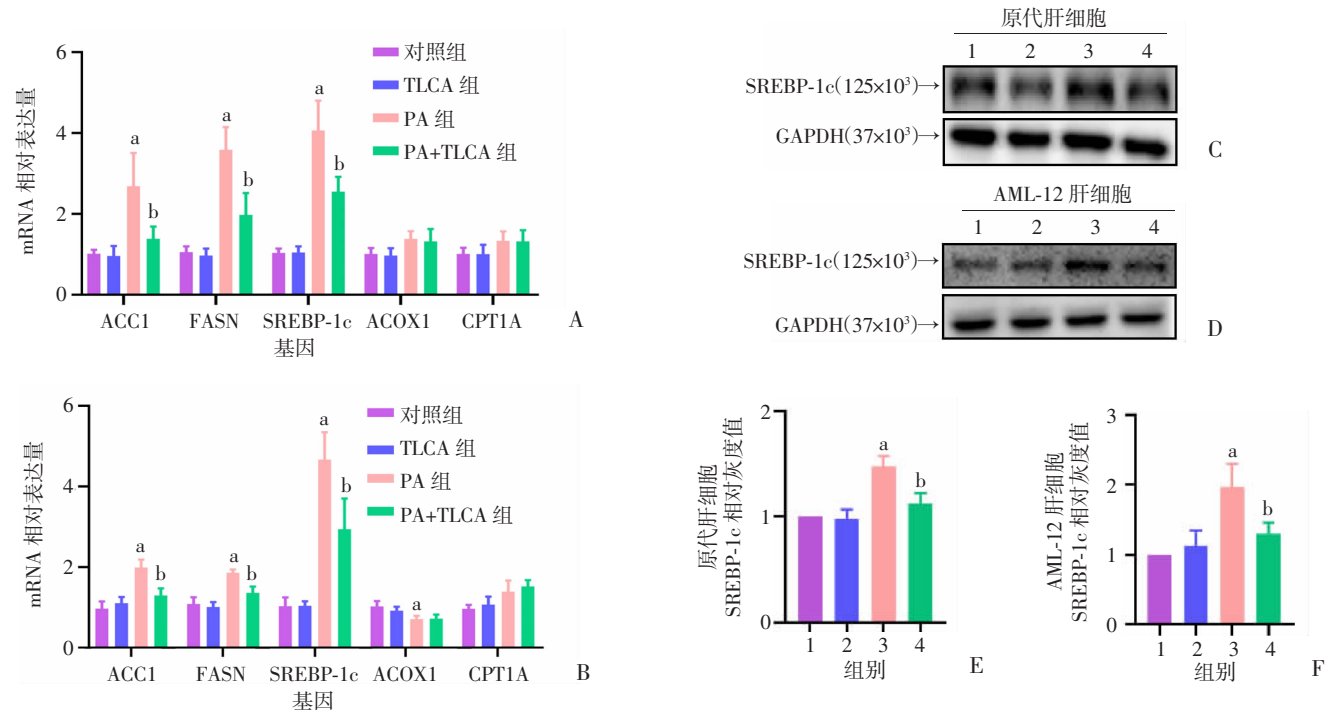
A、B:iNOS、CD206 细胞免疫荧光染色

图 2 TLCA 对 PA 诱导的巨噬细胞 M1/M2 型极化的影响



A:条件培养原代肝细胞;B:条件培养 AML-12 肝细胞

图 3 BODIPY 染色观察 PA 诱导巨噬细胞极化对肝细胞脂质沉积的影响



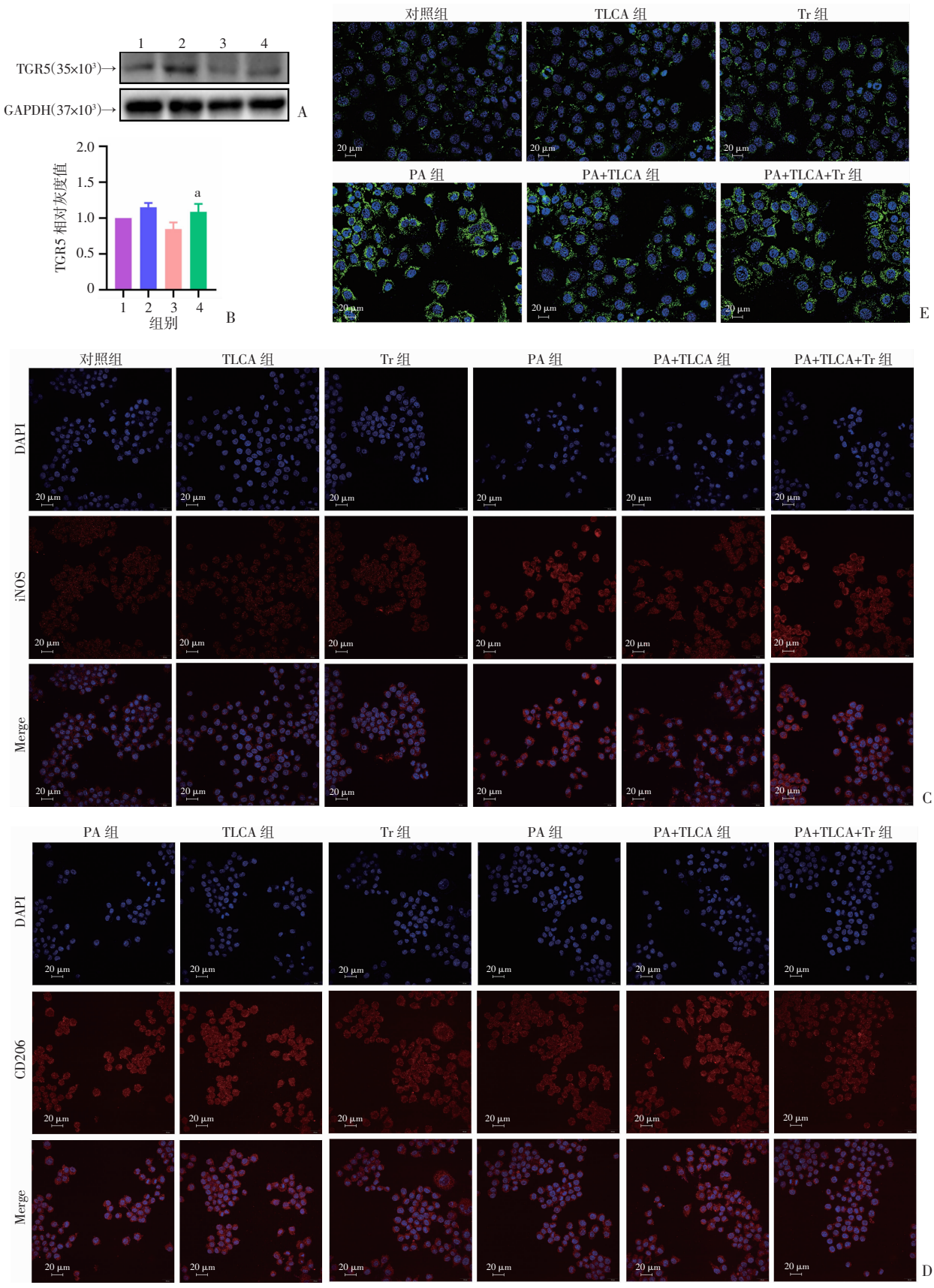
1:对照组;2:TLCA 组;3:PA 组;4:PA+TLCA 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较

A:原代肝细胞脂质代谢相关基因的 mRNA 表达水平($n=5$);B:AML-12 肝细胞脂质代谢相关基因的 mRNA 表达水平($n=5$);C、D:Western blot 检测肝细胞 SREBP-1c 蛋白表达水平;E、F:SREBP-1c 蛋白表达相对灰度值($n=4$)

图 4 肝细胞脂质代谢相关基因的 mRNA 和 SREBP-1c 蛋白水平变化

2.4 氨苯蝶啶抑制巨噬细胞 TGR5,对巨噬细胞极化以及肝细胞脂质沉积的影响

TLCA 单独处理巨噬细胞时,TGR5 蛋白表达较对照组升高,但差异无统计学意义($P=0.071\ 4$);与 PA 组比较,TLCA 联合 PA 处理巨噬细胞后,TGR5 蛋白表达显著升高($P<0.05$,图 5A、B)。免疫荧光结果显示,氨苯蝶啶(Tr)抑制巨噬细胞 TGR5,与 PA+TLCA 组比较,PA+TLCA+Tr 组促进 M1 型极化,抑制巨噬细胞 M2 型极化,能削弱 TLCA 对 PA 诱导巨噬细胞极化的影响(图 5C、D);并且,PA+TLCA+Tr 组肝细胞脂质沉积相较 PA 组并未减少(图 5E)。



A、B:Western blot 检测巨噬细胞 TGR5 蛋白表达及半定量分析($n=4$) 1:对照组;2:TLCA 组;3:PA 组;4:PA+TLCA 组;a:$P<0.05$,与 PA 组比较;C、D:iNOS、CD206 细胞免疫荧光染色;E:AML-12 细胞 BODIPY 荧光染色

图 5 氨苯蝶啶抑制巨噬细胞 TGR5 对巨噬细胞极化以及肝细胞脂质沉积的影响

3 讨论

本研究揭示了 TLCA 通过 TGR5 调节巨噬细胞极化对肝细胞脂肪变性影响的机制。主要发现 TLCA 抑制 PA 诱导的巨噬细胞向 M1 型极化,继而改善炎症及肝细胞的脂质沉积。其中,TLCA 调控巨噬细胞极化的作用依赖于 TGR5。

巨噬细胞是人体免疫调节的重要细胞组成,对机体内环境稳态的维持以及防御功能方面起重要的作用。巨噬细胞根据其高度异质性和可塑性,分为促炎型 M1 型巨噬细胞和抗炎型 M2 型巨噬细胞。研究表明,炎症不仅是 NAFLD 发病机制的基础,而且还推动单纯肝脂肪变性进展为非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)[13-14]。在 NASH 小鼠模型中,小鼠肝脏中 M1/M2 型巨噬细胞比例增加[10],M1 型巨噬细胞通过分泌 IL-1β、TNF-α 等炎症因子作用于肝细胞,促进脂质沉积;相反,M2 型巨噬细胞可诱导 M1 型巨噬细胞凋亡,降低肝脏慢性炎症和保护肝细胞,减轻肝脏脂质沉积[15-16]。以上研究表明,巨噬细胞极化状态与 NAFLD 的发生发展密切相关。本研究中,使用饱和脂肪酸 PA 模拟肝脏中高脂环境处理巨噬细胞,观察到 PA 增加巨噬细胞 M1/M2 型比例,上调炎症水平,与肝细胞共培养后,增加肝细胞的脂质沉积,与既往报道类似。

相对于普通人群,肥胖人群中 NAFLD 的发病率增加了 7~10 倍[17]。因此,肥胖相关炎症被认为是 NAFLD 发病的关键因素。当 M1/M2 型巨噬细胞比例升高,巨噬细胞促炎活化,释放 TNF-α、IL-6 等炎症因子,炎症可能通过增加肝细胞脂肪生成酶如乙酰辅酶 a 羧化酶 1(acetyl CoA carboxylase 1, ACC1)和脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FASN)的基因表达和减少脂肪酸氧化如肉碱棕榈酰转移酶 1A(cainitine plamitoyltransferase 1, CPT1A)基因的肝脏表达而导致肝脏脂肪变性[18-19]。肝脏脂肪代谢异常主要是由于脂肪酸氧化受损、脂肪吸收或合成增加,SREBP-1c 是参与肝脏调控脂肪酸、甘油三酯和胆固醇合成的关键转录因子,可以激活下游靶基因,从而使多种脂肪酸从头合成基因的表达增加,如 FASN 和 ACC1[20]。研究报道,M1 型巨噬细胞通过上调 SREBP-1C 的表达来促进肝细胞脂肪积聚[21]。本研究中,使用 PA 模拟肝脏高脂环境,观察到巨噬细胞 M1/M2 比例增加,通过上调肝细胞脂质合成基因 ACC1、FASN 和 SREBP-1C 的表达促进脂肪沉积。

牛磺石胆酸具有抑制炎症的作用。本研究通过联合 TLCA 干预 PA 诱导的巨噬细胞极化过程,结果显示 M1/M2 型巨噬细胞极化比例显著下调,M1 型相关促炎因子(iNOS、IL-6、IL-1β、TNF-α)表达显著降低,M2 型相关因子(Arg1、IL-4、IL-10)显著升高,进一步细胞共培养实验也证实,联合 TLCA 干预,显著改善 PA 诱导的肝细胞脂质沉积。说明 TLCA 通过调控巨噬细胞极化调节炎症状态,进而改善肝细胞脂质沉积。

胆汁酸是肝脏中胆固醇分解的最终产物,主要通过法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)和 TGR5 调节机体能量代谢和免疫功能等过程[22]。本研究前期研究发现 TLCA 调控细胞功能的机制与 TGR5 激活有关。TGR5 可以被胆汁酸和特异性激动剂激活,其广泛表达于肝脏的多种细胞,包括 Kupffer 细胞(肝脏固有巨噬细胞)和窦内皮细胞。TGR5 信号通路参与调节炎症反应、葡萄糖稳态和能量消耗[22]。本研究显示,TLCA 可激活 TGR5,促进巨噬细胞向 M2 型极化,降低炎症水平;使用 TGR5 抑制剂氨苯蝶啶预处理巨噬细胞,抑制 TGR5 的活性与表达,明显削弱了 TLCA 对巨噬细胞极化的调节作用,及改善肝细胞脂质沉积的作用。说明,TGR5 通路是 TLCA 调控巨噬细胞功能的关键通路,但具体的分子机制有待后续进一步的探索。

综上所述,TLCA 通过巨噬细胞 TGR5 抑制 PA 诱导的 M1 型巨噬细胞极化,进而改善炎症及肝细胞脂质沉积。

参考文献:

[1] European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2016, 64(6): 1388-1402. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.11.004.

[2] LE M H, YEO Y H, LI X H, *et al*. 2019 global NAFLD prevalence: a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2022, 20(12): 2809-2817.e28. DOI: 10.1016/j.cgh.2021.12.002.

[3] ZHOU J H, ZHOU F, WANG W X, *et al*. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China[J]. Hepatology, 2020, 71(5): 1851-1864. DOI: 10.1002/hep.31150.

[4] SUN Y Y, LI X F, MENG X M, *et al*. Macrophage phenotype in liver injury and repair[J]. Scand J Immunol, 2017, 85(3): 166-174. DOI: 10.1111/sji.12468.

[5] MURRAY P J. Macrophage polarization[J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 541-566. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.

[6] CAI Y L, LI H G, LIU M Y, *et al*. Disruption of adenosine 2A receptor exacerbates NAFLD through increasing inflammatory responses and SREBP1c activity [J]. Hepatology, 2018, 68(1): 48-61. DOI: 10.1002/hep.29777.

[7] WANG D Q H, CAREY M C. Therapeutic uses of animal biles in traditional Chinese medicine: an ethnopharmacological, biophysical chemical and medicinal review[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(29): 9952-9975. DOI: 10.3748/wjg.v20.i29.9952.

[8] KAWAMATA Y, FUJII R, HOSOYA M, *et al*. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids[J]. J Biol Chem, 2003, 278(11): 9435-9440. DOI: 10.1074/jbc.M209706200.

[9] KEITEL V, DONNER M, WINANDY S, *et al*. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 372(1): 78-84. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.04.171.

[10] SHI Y, SU W T, ZHANG L, *et al*. TGR5 regulates macrophage inflammation in nonalcoholic steatohepatitis by modulating NLRP3 inflammasome activation [J]. Front Immunol, 2021, 11: 609060. DOI: 10.3389/fimmu.2020.609060.

[11] HOLTER M M, CHIRIKJIAN M K, BRIERE D A, *et al*. Compound 18 improves glucose tolerance in a hepatocyte TGR5-dependent manner in mice[J]. Nutrients, 2020, 12(7): 2124. DOI: 10.3390/nu12072124.

[12] 王妙然, 李月, 张芸绮, 等. 基于网络药理学牛磺石胆酸抗炎作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(11): 1614-1619. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2021.11.023.
WANG M R, LI Y, ZHANG Y Q, *et al*. Anti-inflammatory effect and mechanism of taurocholic acid based on network pharmacology[J]. Chin Pharmacol Bull, 2021, 37(11): 1614-1619. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2021.11.023.

[13] MA L Q, LI H G, HU J B, *et al*. Indole alleviates diet-induced hepatic steatosis and inflammation in a manner involving myeloid cell 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3[J]. Hepatology, 2020, 72(4): 1191-1203. DOI: 10.1002/hep.31115.

[14] WANG X X, RAO H Y, ZHAO J M, *et al*. STING expression in monocyte-derived macrophages is associated with the progression of liver inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Lab Investig, 2020, 100(4): 542-552. DOI: 10.1038/s41374-019-0342-6.

[15] HU Q, LYON C J, FLETCHER J K, *et al*. Extracellular vesicle activities regulating macrophage- and tissue-mediated injury and repair responses[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(6): 1493-1512. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.12.014.

[16] LIU C, RAJAPAKSE A G, RIEDO E, *et al*. Targeting arginase-Ⅱ protects mice from high-fat-diet-induced hepatic steatosis through suppression of macrophage inflammation [J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 1-13. DOI: 10.1038/srep20405.

[17] QUEK J, CHAN K E, WONG Z Y, *et al*. Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2023, 8(1): 20-30. DOI: 10.1016/S2468-1253(22)00317-X.

[18] KANG K, REILLY S M, KARABACAK V, *et al*. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARδ regulate macrophage polarization and insulin sensitivity[J]. Cell Metab, 2008, 7(6): 485-495. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.04.002.

[19] MENGHINI R, MENINI S, AMORUSO R, *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 deficiency causes hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in mice [J]. Gastroenterology, 2009, 136(2): 663-672.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.10.079.

[20] IPSEN D H, LYKKESFELDT J, TVEDEN-NYBORG P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(18): 3313-3327. DOI: 10.1007/s00018-018-2860-6.

[21] 张翔, 伍若楠, 刘家静, 等. M1 型巨噬细胞促进非酒精性脂肪性肝炎[J]. 中华消化杂志, 2022, 42(2): 73-82. DOI: 10.3760/cma.j.cn311367-20210914-00497.
ZHANG X, WU R N, LIU J J, *et al*. M1 macrophages promote non-alcoholic steatohepatitis [J]. Chin J Dig, 2022, 42(2): 73-82. DOI: 10.3760/cma.j.cn311367-20210914-00497.

[22] RAJAGOPAL S, PONNUSAMY M. Metabotropic GPCRs: TGR5 and P2Y receptors in health and diseases [M]. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2008:1-85. https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-13-1571-8.

(收稿:2023-04-13;修回:2023-05-22)
(编辑 邓强庭)