

经外泌体释放的高迁移率族蛋白 B1 在菌群紊乱非酒精性脂肪性肝病小鼠中的表达及 Toll 样受体 4 信号的调控作用

孙焕焕, 李培杰, 冯云, 刘梦莹, 师文, 马富权, 和水祥*

西安交通大学医学院第一附属医院消化内科, 陕西西安 710061

[中图分类号] R575.1 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2484.2023.0804

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 孙焕焕, 李培杰, 冯云, 等. 经外泌体释放的高迁移率族蛋白 B1 在菌群紊乱非酒精性脂肪性肝病小鼠中的表达及 Toll 样受体 4 信号的调控作用[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(11): 1314-1320.

[收稿日期] 2022-11-30 [录用日期] 2023-03-08 [上线日期] 2023-08-04

[摘要] **目的** 探讨非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)小鼠中肠源性及肝源性高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)经外泌体的释放情况及其调控途径。**方法** 15 只雄性 8 周龄野生型 C57BL/6J 小鼠及 10 只合并肠道菌群紊乱的 NAFLD 小鼠(ASC^{-/-})模型。10 只野生型小鼠喂食正常饲料(ND)为正常对照组、喂养高脂饮食(HFD)为高脂饮食组, 每组 5 只, 另外 5 只用于了解造模情况。10 只 ASC^{-/-}小鼠分别喂养 ND(菌群紊乱组)及 HFD(高脂菌群紊乱组), 每组 5 只。共喂养 8 周。采用共聚焦显微镜检测肝脏及肠黏膜外泌体标志物与 HMGB1 共定位情况; 采用 Western blotting 及 PCR 等方法检测外泌体中 HMGB1 含量。通过棕榈酸(PA)及脂多糖(LPS)处理 AML12 细胞 24 h 构建体外模型, 采用 Western blotting 检测 HMGB1/CD63 水平, 并通过 siRNA 干预探讨经外泌体释放的调控机制。**结果** 高脂饮食组的外泌体分泌较正常对照组增多[(3.5±0.2) ng/ml vs. (1.1±0.3) ng/ml, P<0.05], 高脂菌群紊乱组的外泌体亦高于菌群紊乱组[(3.2±0.2)ng/ml vs. (1.9±0.4) ng/ml, P<0.05]。免疫荧光检测结果显示, 体内实验高脂饮食组与正常对照组比较, 体外实验高脂内毒素组与空白对照组比较, 外泌体标记物(ALP 或 VPS16)与 HMGB1 的共定位增加。PCR 检测发现, 高脂饮食组肝细胞外泌体中的 HMGB1 较正常对照组升高(41.5±10.2 vs. 1.3±0.3, P<0.05), 高脂菌群紊乱组较菌群紊乱组升高(48.6±7.2 vs. 1.5±0.5, P<0.05); 高脂饮食组 TLR4 较正常对照组升高(13.8±6.2 vs. 2.8±0.9, P<0.05), 高脂菌群紊乱组较菌群紊乱组升高(22.6±4.1 vs. 2.5±1.5, P<0.05)。在肠黏膜细胞中, 高脂饮食组较正常对照组(0.6±0.2 vs. 0.4±0.1, P<0.05)及高脂菌群紊乱组较菌群紊乱组(0.9±0.2 vs. 0.5±0.1, P<0.05)中 HMGB1 与外泌体标记物(CD63)共显影增加。在体外实验中, 内毒素组、高脂内毒素组外泌体的 HMGB1(5.1±0.8, 5.5±0.7)均较空白对照组(3.8±0.6)增加(P<0.05), 而 siRNA 干预组与空白对照组比较无明显差异(3.7±0.6 vs. 3.8±0.6, P>0.05)。**结论** 在高脂饮食及肠道菌群紊乱环境下, HMGB1 在肝细胞及肠细胞中经外泌体释放, 并受 TLR4 调控, 可能是促进脂肪性肝炎发展的因素之一。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝病; 脂肪性肝炎; 高迁移率族蛋白 B1; 外泌体; Toll 样受体 4

Expression of high-mobility group B1 released by exosome in nonalcoholic fatty liver disorder and regulated by TLR4 signal

Sun Huan-Huan, Li Pei-Jie, Feng Yun, Liu Meng-Ying, Shi Wen, Ma Fu-Quan, He Shui-Xiang*

Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China

*Corresponding author, E-mail: dyyyjxk@mail.xjtu.edu.cn

This work was supported by the Key Research and Development Project of Shaanxi Province (2019SF-171, 2018SF-051)

[Abstract] **Objective** To investigate the release of enterogenic and hepatogenic high mobility group protein B1 (HMGB1) through exosomes and its regulatory pathway. **Methods** We used wild-type (WT) and ASC^{-/-} mice for this study. We randomly selected five mice per group from each strain and fed them either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFD) for eight weeks. The control group

[基金项目] 陕西省重点研发计划(2019SF-171, 2018SF-051)

[作者简介] 孙焕焕, 医学博士, 助理研究员, 主要从事非酒精性脂肪性肝病等的基础及临床研究

[通信作者] 和水祥, E-mail: dyyyjxk@mail.xjtu.edu.cn

consisted of WT mice fed with the normal diet; the HFD group were WT mice with the HFD; the microflora disturbance (MD) group were ASC^{-/-} mice fed with the normal diet; the high-lipid microflora disturbance (HLMD) group were ASC^{-/-} mice with HFD. We used confocal microscopy to detect the co-localization of liver and intestinal exosome markers with HMGB1. We then measured the expression level of HMGB1 content in exosomes by Western blotting and PCR. The AML12 cells were treated with palmitic acid (PA) and lipopolysaccharide (LPS) for 24 h to build an *in vitro* model. We also detected HMGB1/CD63 levels using Western blotting. To understand the regulatory mechanism of exosome release, we employed siRNA intervention. **Results** The secretion of exosomes increased significantly in HFD group compared with control group [(3.5±0.2) ng/ml vs. (1.1±0.3) ng/ml, *P*<0.05], HLMD group compared with those in MD group [(3.2±0.2) ng/ml vs. (1.9±0.4) ng/ml, *P*<0.05]. Using immunofluorescence detection, we observed increased co-localization of exosome markers (ALP or VPS16) with HMGB1 in HFD group compared with control group. We also observed this in AML12 cells treated with PA and LPS compared with blank control. The PCR data showed that HMGB1 in hepatocyte exosomes was higher in HFD group compared with control group (41.5±10.2 vs. 1.3±0.3, *P*<0.05), HLMD group was significantly higher than that in MD group (48.6±7.2 vs. 1.5±0.5, *P*<0.05). TLR4 expression was higher in HFD group compared with control group (13.8±6.2 vs. 2.8±0.9, *P*<0.05), HLMD group compared with MD group (22.6±4.1 vs. 2.5±1.5, *P*<0.05). In intestinal mucosal cells, the co-location of HMGB1 and exosome marker CD63 was significantly higher in HFD group compared with control group (0.6±0.2 vs. 0.4±0.1, *P*<0.05), and HLMD group compared with MD group (0.9±0.2 vs. 0.5±0.1, *P*<0.05). *In vitro*, the HMGB1 of exosomes was increased in endotoxin group (5.1±0.8) and high lipid endotoxin group (5.5±0.7) compared with control group (3.8±0.6, *P*<0.05). On the other hand, the HMGB1 of exosomes in the cell siRNA intervention group was not increased compared with control group (3.7±0.6 vs. 3.8±0.6, *P*>0.05). **Conclusion** HMGB1 is released by exosomes in hepatocytes and intestinal cells, and regulated by Toll-like receptor 4 (TLR4) under a high-fat diet and intestinal flora disorder, which may be one of the contributing factors in promoting the development of steatohepatitis.

[Key words] nonalcoholic fatty liver disease; steatohepatitis; high mobility group protein B1; exosome; Toll-like receptor 4

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是全球范围内的主要慢性肝病之一, 目前全球 25% 的人口被诊断为 NAFLD^[1], 中国 NAFLD 的患病率在过去 20 年内增加了 1 倍。NAFLD 包括单纯性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver, NAFL) 及其演变的脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 和肝硬化, 会进一步发展为肝细胞癌。研究表明, 炎症及肠道菌群紊乱可能在 NAFLD 的进展中发挥关键作用^[2]。在 NAFLD 发病的“多重打击”学说中, 第一个打击是肝脏脂肪水平的增高, 其次包括胰岛素抵抗、肠道微生物群、遗传及环境等多种因素的影响。这些因素影响肝细胞炎症环境, 并与氧化应激及内质网应激相关过程共同作用, 导致线粒体功能障碍^[3]。然而, 炎症及肠道菌群紊乱在 NAFLD 进展过程中的具体机制尚不清楚^[4]。

高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group box 1, HMGB1) 多存在于细胞核内, 发挥着重要的细胞生物学作用, NAFLD 中的 HMGB1 被分泌至胞浆甚至胞外, 在疾病的发生发展中起重要作用^[5], 但 HMGB1 在肝细胞脂肪变性中的细胞分泌机制尚不清楚。外泌体是细胞间信号转导囊泡, 当细胞暴露于某些环境污染物中, 可能诱导外泌体分泌增加, 参与细胞损伤及炎症反应^[6]。近期有研究发现, 外泌体是炎症微环境与脂代谢之间一种新的细胞间通信, 促进了 NAFLD 的进展, 可作为 NAFLD 诊断及治疗靶点的潜在生物标志物^[7]。有研究发现, 甘草次酸可阻断 HMGB1 的表达, 并通过抑制 Toll 样受体 4

(Toll-like receptor 4, TLR4) 通路而增强间充质干细胞来源的外泌体对肝损伤的治疗作用^[8]。研究发现, 外泌体来源的 HMGB1 可通过 TLR 2/4 信号通路激活免疫细胞^[9]。另有研究发现, 细菌内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 通过 TLR4 及半胱天冬酶 (caspase)-11 途径诱导肝细胞释放 HMGB1^[10]。本课题组前期研究通过敲除 ASC 基因 (ASC^{-/-}) 及予高脂饮食 (high fat diet, HFD) 喂养构建了合并肠道菌群紊乱的脂肪肝小鼠模型, 并发现该小鼠血清中 HMGB1 异常升高^[11]。有研究发现, 肝细胞来源的外泌体可通过抑制巨噬细胞活化及细胞因子分泌而促进炎症及纤维化的发生^[12]。上述研究提示 HMGB1 在“多重打击”学说机制中起重要作用, 但目前尚不清楚 HMGB1 的来源及其分泌方式。本研究旨在探讨高脂饮食及肠道菌群紊乱条件下肝细胞、肠细胞源性的 HMGB1 分泌途径及其在脂肪性肝炎中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器 雄性 8 周龄野生型 C57BL/6J 小鼠 15 只及 ASC^{-/-} 小鼠 10 只购自西安交通大学实验动物中心。AML12 小鼠肝实质细胞系购自美国 ATCC 中心。Optima MAX-XP 型超高速离心机购自美国 Beckman Coulter 公司, Fluoview FV1000 共聚焦激光扫描显微镜购自日本 Olympus 公司, 聚合酶链反应 (PCR) 系统购自美国 Bio-Rad 公司。10% 胎牛血清购自美国 Gibco 公司, HMGB1 抗体及碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 抗体购自英国 Abcam 公

司,空泡分选相关蛋白(vacuolar protein sorting, VPS)16抗体、分化抗原(cluster of differentiation, CD)63抗体及山羊抗兔IgG等购自美国Santa Cruz公司,反转录酶试剂盒购自日本TaKaRa公司。

1.2 动物模型构建及分组 5只雄性8周龄野生型小鼠喂食高脂饲料(HFD, #D12492, 研究饲料),分别于第1、2、3、5、7周处死1只用于了解造模情况。10只雄性8周龄野生型小鼠随机分组:喂食正常饲料(ND)为正常对照组($n=5$),喂养HFD为高脂饮食组($n=5$),10只雄性8周龄ASC^{-/-}小鼠随机分组:喂养ND为菌群紊乱组($n=5$),喂养HFD为高脂菌群紊乱组($n=5$)。喂养8周后,自尾静脉取血并处死小鼠,取其肝组织。本研究获西安交通大学医学院第一附属医院动物保护及使用委员会批准(审批号:2020529)。

1.3 细胞模型构建及干预处理 将AML12小鼠肝细胞系培养于含10%胎牛血清的细胞培养基中(95%空气及5%CO₂, 37℃)。待AML12细胞存活率为90%时,将细胞分组如下:未给予任何干预为空白对照组,使用棕榈酸(palmitic acid, PA)处理24h为内毒素组,经200 μmol/ml PA及10 μg/ml LPS处理24h为高脂内毒素组,TLR4 siRNA预处理并经200 μmol/ml PA及10 μg/ml LPS处理24h为siRNA干预组。

1.4 外泌体离心、收集及计数 通过超速离心从培养基上清液中纯化及分离外泌体。将1 ml血清外泌体以300×g离心10 min,用无菌磷酸缓冲盐溶液(PBS)按1:1比例稀释血清,10 000×g离心30 min,200 000×g超速离心2 h。将外泌体在PBS中洗涤1次,0.2 mm过滤器过滤,200 000×g离心1 h,然后在PBS中重悬获取外泌体。所有离心均在4℃下进行。通过Nanosight仪观察外泌体数量。

1.5 HE染色检测肝脏NAFLD活动指数 通过肝脏组织HE染色观察NAFLD活动指数,包括脂肪变性(0-3分)、肝小叶炎症(0-3分)、气球样变性(0-2分),是目前病理评估NAFLD病变程度的金标准。

1.6 免疫组织化学(IHC)染色检测肝组织HMGB1、抗IL-1β水平 将小鼠肝组织载玻片分别用抗HMGB1抗体(1:200)及抗IL-1β(1:200)孵育后,于4℃条件下过夜,用3%过氧化氢洗涤20 min,10%血清阻断30 min,然后用二抗孵育,染色固定后,使用Image-Pro Plus 6.0软件计算阳性染色的面积百分比。

1.7 免疫荧光共聚焦显微镜检测HMGB1、ALP、VPS16、CD63共显影情况 将冷冻的肝、肠组织在4% PFA/PBS中处理15 min,用Triton X-100及PBS冲洗后,分别经抗HMGB1、抗CD63、抗ALP或抗VPS16抗体孵育后,于4℃条件下过夜。洗涤后,将载玻片与Alexa-488(绿色)或Alexa-555(红色)标记的二抗在室温下孵育1 h,使用共聚焦激光扫描显微镜对

载玻片进行检测并拍照,使用Image-Pro Plus 6.0软件通过皮尔森相关系数分析共定位(黄色)。

1.8 PCR检测HMGB1、TLR4基因表达水平 用Trizol从小鼠血清中分离RNA,按反转录试剂盒说明书反转录成cDNA,以cDNA为模板进行PCR扩增,在Bio-Rad PCR系统上对HMGB1、TLR4进行SYBR绿色荧光定量PCR。HMGB1上游引物:5'-TTGTCGGAGAGCATAA-3',下游引物:5'-GGGCGATACTCAGAGCAGAA-3',扩增产物长度为267 bp。TLR4上游引物:5'-AATTTGGACGAGCTCATGATGCCTCCCTGGCTCCT-3',下游引物:5'-AACCTTGGCTGGTACCCGTCAGGTCCAAGTTGCCGTTTCT-3',扩增产物长度为2508 bp。

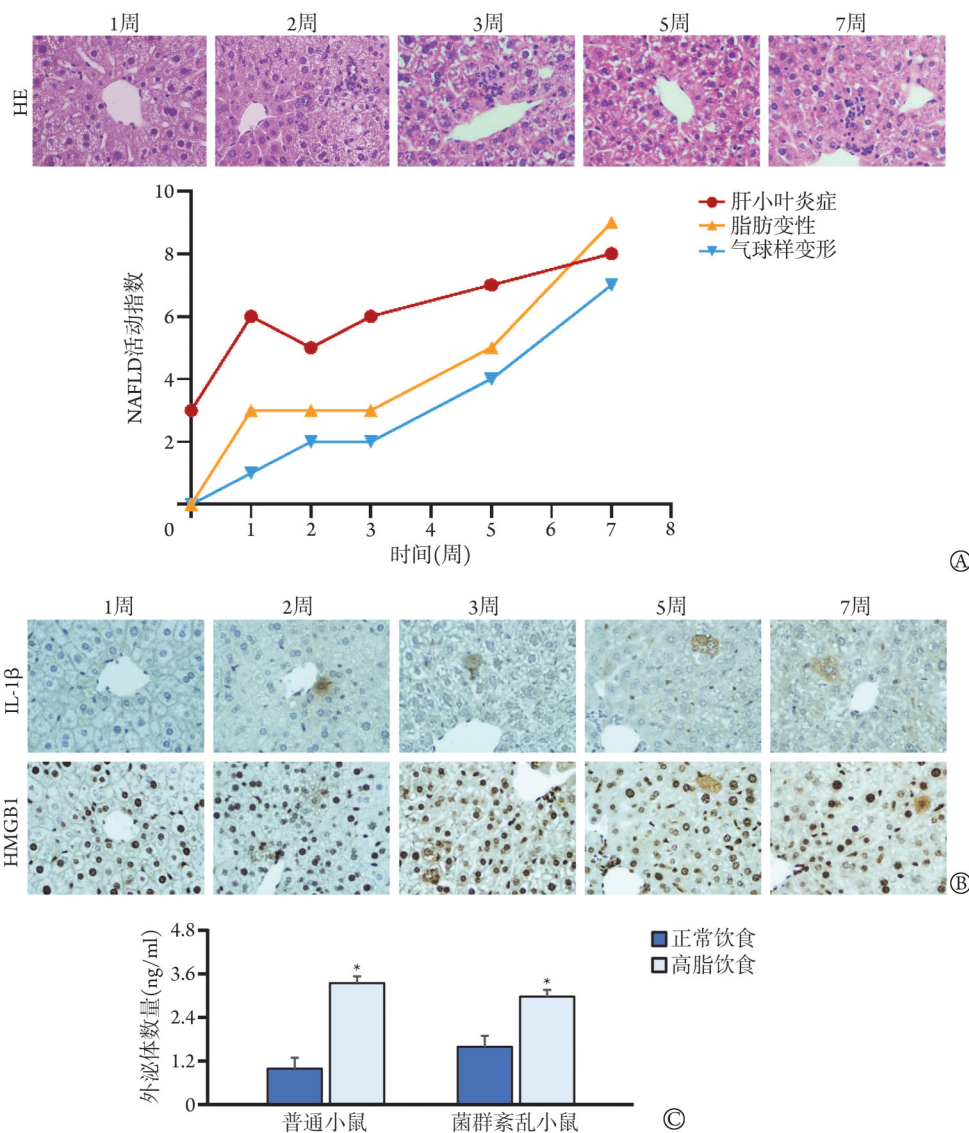
1.9 Western blotting检测HMGB1及CD63蛋白表达水平 将来自外泌体的蛋白质用SDS缓冲液变性并煮沸5 min;在SDS凝胶上电转移至PVDF膜上,用5%牛奶封闭;加入兔抗HMGB1(1:5000)及兔抗CD63(1:10 000),在4℃下与探针膜过夜;与山羊抗兔IgG(1:5000)在室温下孵育1 h;洗涤3次后,用化学发光技术检测免疫反应条带,然后在X线下曝光。使用ImageJ软件计算其表达水平,CD63为内参照,结果以HMGB1与CD63的比值表示。

1.10 统计学处理 采用GraphPad Prism软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),进一步行Turkey检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂条件下肝细胞HMGB1及血清外泌体的表达 将高脂饮食组小鼠分别于1、2、3、5及7周各处死1只,以确认脂肪肝小鼠造模成功。HE染色发现,小鼠肝脏NAFLD活动指数中的脂肪变性、肝小叶炎症及气球样变性等各子项评估分值均逐渐升高(图1A)。IHC染色发现,随着小鼠脂肪变性、炎症指数及相关指标(IL-1β)的升高,HMGB1的核内表达数量增多,并于第3周出现胞质内表达(图1B)。HMGB1在脂肪性肝炎的发生发展过程中逐渐增多,并由细胞核分泌至胞质。Nanosight检测发现,高脂饮食组的外泌体水平高于正常对照组[(3.5±0.2) ng/ml vs. (1.1±0.3) ng/ml, $P < 0.05$];高脂菌群紊乱组的外泌体亦高于菌群紊乱组[(3.2±0.2) ng/ml vs. (1.9±0.4) ng/ml, $P < 0.05$, 图1C]。

2.2 肝细胞源性HMGB1经外泌体的分泌途径 共聚焦显微镜检测发现,在高脂饮食组小鼠的肝脏细胞中,HMGB1与外泌体标志物(ALP或VPS16)可发生共定位,而正常对照组几乎没有(图2A)。在体外实验中,细胞高脂内毒素组中HMGB1与外泌体标志



A. 高脂饮食野生型小鼠病理学检验结果(HE ×40)及NAFLD 活动指数; B. 免疫组织化学染色观察肝细胞IL-1β 及HMGB1 的核外表达(×40); C. 正常饲料与高脂饲料组小鼠外泌体数量比较(n=5); *P<0.05

图1 高脂饮食小鼠肝脏脂肪变、炎症、HMGB1 及血清外泌体数量变化
Fig.1 Changes in liver steatosis, inflammation, HMGB1 and serum exosomes in high-fat diet mice

物(ALP 或 VPS16)在胞质中富集并发生共定位, 较细胞空白对照组明显增多(图2B)。

2.3 肝源性外泌体中 HMGB1 及 TLR4 mRNA 表达水平 小鼠肝细胞外泌体中 HMGB1 mRNA 在高脂饮食组较正常对照组(41.5±10.2 vs. 1.3±0.3, P<0.05)、高脂菌群紊乱组较菌群紊乱组(48.6±7.2 vs. 1.5±0.5, P<0.05, 图3A)均升高。同样 TLR4 mRNA 在高脂饮食组(13.8±6.2 vs. 2.8±0.9, P<0.05)和高脂菌群紊乱组(22.6±4.1 vs. 2.5±1.5, P<0.05, 图3B)中亦升高。

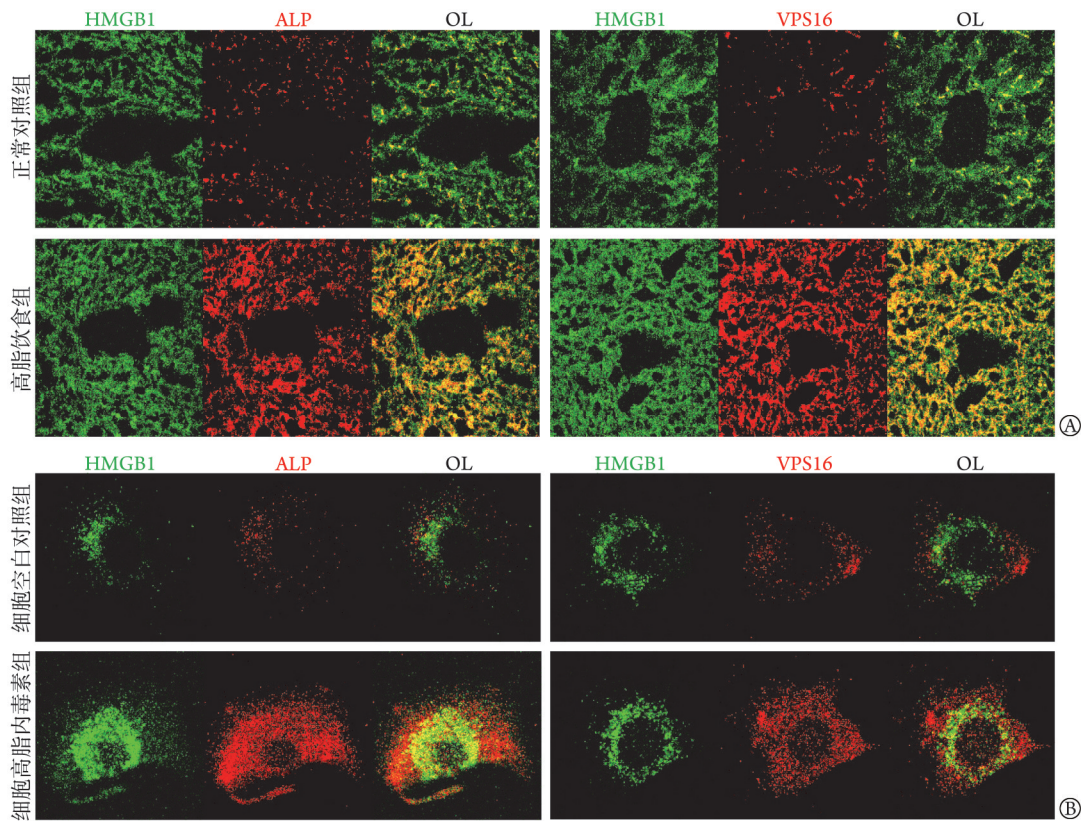
2.4 肠源性 HMGB1 经外泌体的分泌途径 通过免疫荧光检测肠黏膜细胞标记了绿色荧光的 CD63(外泌体标志物), 以及标记了红色荧光的 HMGB1 之间的共定位情况, 结果显示(图4A), 高脂饮食普通小鼠高于正常饮食普通小鼠(P<0.05), 高脂菌群紊乱小鼠

高于正常饮食菌群紊乱小鼠(0.9±0.2 vs. 0.5±0.1, P<0.05, 图4B)。

2.5 肝源性细胞外泌体中及经 TLR4 siRNA 干预的 HMGB1 表达水平 Western blotting 检测结果显示, 细胞内毒素组(5.1±0.8 vs. 3.8±0.6, P<0.05)及细胞高脂内毒素组(5.5±0.7 vs. 3.8±0.6, P<0.05)外泌体 HMGB1 蛋白表达水平均高于空白对照组; 而经 TLR4 siRNA 预干预的细胞 siRNA 干预组与空白对照组比较差异无统计学意义(3.7±0.6 vs. 3.8±0.6, P>0.05, 图5)。

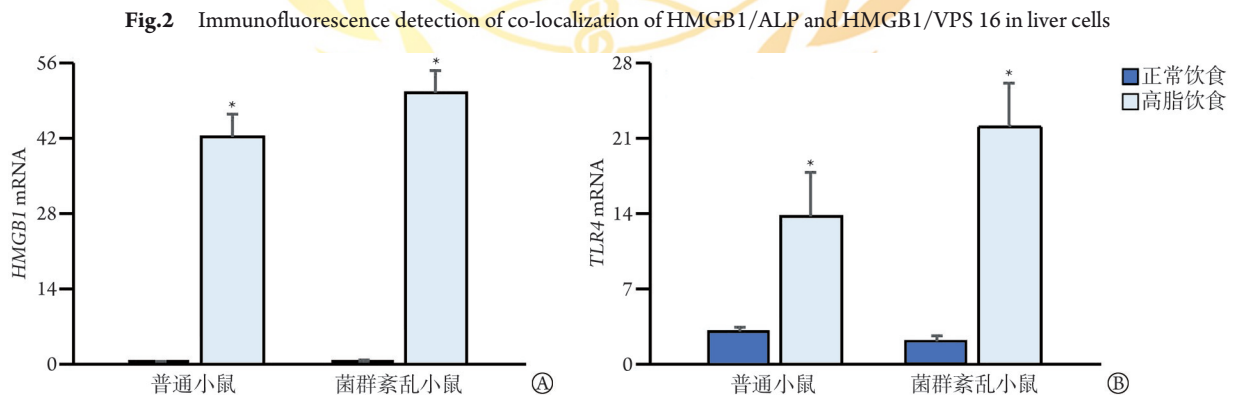
3 讨论

NAFLD 是全球慢性肝病的主要病因之一, 是一种与胰岛素抵抗及遗传易感性密切相关的代谢应激性肝损伤, 脂肪毒性、炎性细胞因子、趋化因子及



HMGB1. 高迁移率族蛋白 B1; ALP. 碱性磷酸酶; VPS. 空泡分选相关蛋白; OL. 共定位; A. 共聚焦显微镜检测高脂饮食组与正常对照组小鼠肝脏细胞中 HMGB1 与外泌体标记物(ALP 或 VPS16) 的共定位情况; B. 经高脂处理后肝脏细胞胞质中 HMGB1 及外泌体标记物(ALP 或 VPS16) 共定位情况

图2 免疫荧光检测 HMGB1/ALP 及 HMGB1/VPS 16 在肝细胞中的共定位



A. HMGB1 mRNA 水平($n=5$); B. TLR4 mRNA 水平($n=5$); * $P<0.05$

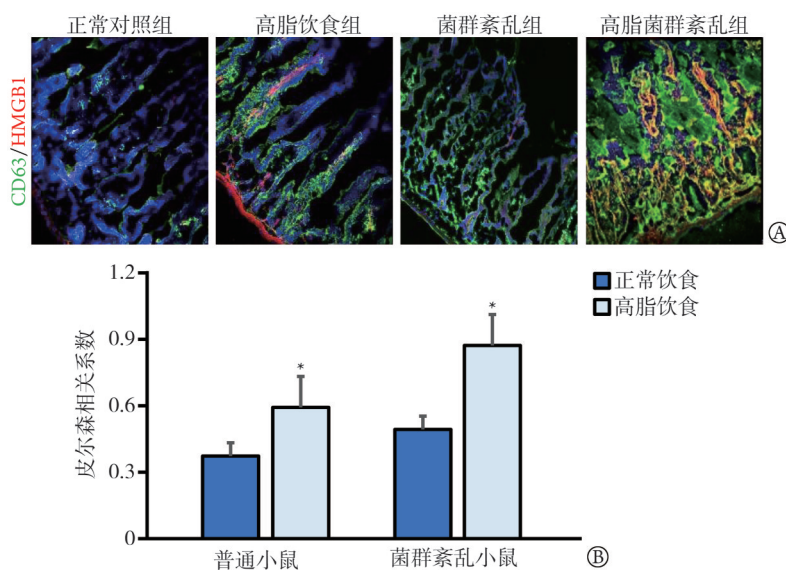
图3 PCR检测肝细胞外泌体 HMGB1 及 TLR4 mRNA 表达水平

Fig.3 The expression levels of HMGB1 and TLR4 genes in liver cells detected by PCR

肠道菌群失衡等可触发肝脏及全身炎症级联反应,是NAFLD“多重打击”学说的理论基础^[13]。近年来,对NAFLD病理生物学的研究发现,免疫介导炎症是NAFLD的关键因素之一^[14]。在高脂饮食和肠道菌群紊乱下,均可加重NAFLD中肝脏细胞的炎症状态,本研究也观察到同样的现象。肝脏细胞与肠黏膜细胞的相关炎症因子及其调控机制是目前研究的热点。

HMGB1是一种高度保守的核蛋白,当转移至胞

质或胞外后,具有促进细胞迁移、影响免疫功能及诱导炎症反应等作用。HMGB1是肝损伤后巨噬细胞产生的炎症因子,在促进非酒精性脂肪性肝炎(NASH)进展并进一步发展为肝纤维化和肝硬化中起关键作用。研究发现,高脂饮食可导致小鼠血清中HMGB1含量上升^[15]。有研究发现,通过siRNA沉默HMGB1蛋白表达后具有治疗NASH的作用^[16]。近期一项研究发现,炎症状态下可造成血清中外泌体源性的HMGB1含量增多^[10]。本研究分别通过蛋白和



A. 免疫荧光检测肠黏膜细胞外泌体的标志物 CD63 与 HMGB1 的共定位情况；B. 各组小鼠 CD63/HMGB1 比值的皮尔森相关系数比较 (n=5); *P<0.05

图4 免疫荧光检测小鼠肠黏膜细胞中 HMGB1 及 CD63 的共定位情况

Fig.4 Immunofluorescence detection of co-localization of HMGB1 and CD63 in mouse intestinal mucosal cells

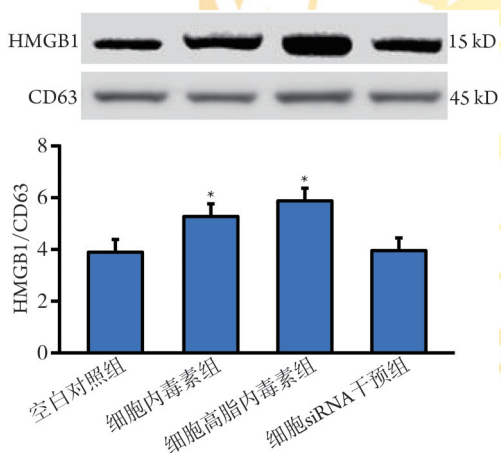


图5 各组细胞外泌体中 HMGB1 及 CD63 蛋白水平比较 (Western blotting, n=5)

Fig. 5 Comparison of HMGB1 and CD63 protein levels in extracellular vesicles of each group (Western blotting, n=5)

基因表达层面检测发现，在脂肪肝小鼠及合并肠道菌群紊乱的脂肪肝小鼠中均出现 HMGB1 和外泌体含量增多的现象。

外泌体是指包含了复杂 RNA 和(或)蛋白质的小膜泡，目前特指直径为 40~100 nm 的盘状囊泡。1983 年，外泌体首次于绵羊网织红细胞中被发现，近年已被证实外泌体为细胞间有效的通讯器，可把源细胞的因子带到靶细胞，并参与正常或病理状态下细胞间的交流。外泌体可能参与 NAFLD、肥胖等代谢异常的细胞间交流，并可能成为检测标志物或干预的方式^[17]。外泌体介导的细胞间通信参与 NAFLD 的发展，受损的肝细胞或非实质细胞释放大量外泌体，

通过与邻近细胞的相互作用促进炎症和纤维化的进展^[18]。本研究发现，高脂饮食组及高脂菌群紊乱组外泌体中 HMGB1 水平较正常对照组升高，且肝细胞的免疫荧光共定位结果也提示 HMGB1 是通过外泌体分泌到胞外的途径。近期有研究发现，给予短期的高脂或高糖饮食后，可诱发血清中外泌体相关 mRNA 增加^[19]。另有研究发现，持续食用高能量饲料可诱导由肝源性外泌体介导的脂质累积增加^[20]。上述研究均与本研究结果相似，进一步明确了 HMGB1 经外泌体分泌的途径，进而促进 NAFLD 疾病的进程。

代谢紊乱及肠道菌群失衡可导致 NAFLD 进展为脂肪性肝炎^[21]。然而，其具体机制仍不甚清楚。本研究发现，高脂饮食组肠黏膜细胞源性外泌体标志物 CD63 与 HMGB1 共显影增加，并在肠道菌群紊乱组升高更为明显，证实了 HMGB1 在代谢紊乱及菌群紊乱下经外泌体途径从肠黏膜中分泌的现象。文献报道了 HMGB1 依赖于晚期糖基化终产物(receptor of advanced glycation endproducts, RAGE)及氧化还原信号介导的炎症的新途径，该途径可促进 NAFLD 下肠黏膜的炎症进展^[22]。近期一篇综述阐明了微生物源性外泌体与 NAFLD 发病机制存在密切联系，提示在菌群紊乱下可能通过微生物源性外泌体加重炎症、肠道屏障损伤等，因此发掘外泌体的特性将为临床治疗及创新药物研发提供理论框架^[23]。随着本研究进一步证实 HMGB1 在肠黏膜的分泌途径，将为 HMGB1 在 NAFLD 的药物研发工作中发挥一定作用。

本研究的体外实验通过在 PA 及 LPS 的刺激下，

观察到肝细胞分泌的外泌体中HMGB1水平升高,并在敲除TLR4后降低,提示HMGB1经外泌体分泌的途径受TLR4调控。由此推断, HMGB1可能是在TLR4调控下通过外泌体途径释放,且在肠道菌群失衡下释放增加,参与并加剧了NAFLD的疾病进程。有研究同样发现LPS可通过TLR4及Caspase-11/GSDMD信号通路诱导肝细胞源性的外泌体释放增加^[24]。另一项研究提示敲除HMGB1基因可使肠道脂质吸收减少,并可减轻小鼠脂肪性肝炎的严重程度^[25]。上述多个研究证实了TLR4通路和HMGB1的相关性,本研究进一步证实了HMGB1的外泌体分泌途径也经TLR4调控。但本研究数据均来自动物实验,仍需临床研究证实HMGB1作为无创筛查分子标志物的可行性。同时,若能进一步得到分子机制的研究证实,将可能为脂肪肝靶向药物的研究提供理论基础。

综上所述,在伴肠道菌群紊乱的脂肪性肝炎中,肝细胞及肠黏膜细胞受TLR4信号通路调控将含HMGB1的外泌体分泌入血,进而导致肝脏脂肪性变及炎症的加重。

【参考文献】

- [1] Younossi Z, Tacke F, Arrese M, *et al.* Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2019, 69(6): 2672-2682.
- [2] Wesolowski SR, Kasmi KC, Jonscher KR, *et al.* Developmental origins of NAFLD: a womb with a clue[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(2): 81-96.
- [3] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Metabolism*, 2016, 65(8): 1038-1048.
- [4] Kjærgaard K, Mikkelsen ACD, Wernberg CW, *et al.* Cognitive dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease-current knowledge, mechanisms and perspectives[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(4): 673.
- [5] Arriazu E, Ge XD, Leung TM, *et al.* Signalling via the osteopontin and high mobility group box-1 axis drives the fibrogenic response to liver injury[J]. *Gut*, 2017, 66(6): 1123-1137.
- [6] Sheller-Miller S, Radnaa E, Arita Y, *et al.* Environmental pollutant induced cellular injury is reflected in exosomes from placental explants[J]. *Placenta*, 2020, 89: 42-49.
- [7] Yao JM, Ying HZ, Zhang HH, *et al.* Exosomal RBP4 potentiated hepatic lipid accumulation and inflammation in high-fat-diet-fed mice by promoting M1 polarization of Kupffer cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 195: 58-73.
- [8] Wei XL, Zheng WJ, Tian PK, *et al.* Administration of glycyrrhetic acid reinforces therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived exosome against acute liver ischemia-reperfusion injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(19): 11211-11220.
- [9] Ye LS, Zhang Q, Cheng YS, *et al.* Tumor-derived exosomal HMGB1 fosters hepatocellular carcinoma immune evasion by promoting TIM-1⁺ regulatory B cell expansion[J]. *J Immunother*
- [10] Li WB, Deng MH, Loughran PA, *et al.* LPS induces active HMGB1 release from hepatocytes into exosomes through the coordinated activities of TLR4 and caspase-11/GSDMD signaling[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 229.
- [11] Chen Y, Sun HH, Bai Y, *et al.* Gut dysbiosis-derived exosomes trigger hepatic steatosis by transiting HMGB1 from intestinal to liver in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(3): 767-772.
- [12] Hou X, Yin S, Ren RX, *et al.* Myeloid-cell-specific IL-6 signaling promotes microRNA-223-enriched exosome production to attenuate NAFLD-associated fibrosis[J]. *Hepatology*, 2021, 74(1): 116-132.
- [13] Ma C, Wang C, Zhang YF, *et al.* Potential natural compounds for the prevention and treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a review on molecular mechanisms[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2022, 15(6): 846-861.
- [14] Srinivas AN, Suresh D, Santhekadur PK, *et al.* Extracellular vesicles as inflammatory drivers in NAFLD[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 627424.
- [15] Miao H, Ouyang H, Guo Q, *et al.* Chlorogenic acid alleviated liver fibrosis in methionine and choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in mice and its mechanism[J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 106: 109020.
- [16] Zhou JE, Sun L, Liu L, *et al.* Hepatic macrophage targeted siRNA lipid nanoparticles treat non-alcoholic steatohepatitis[J]. *J Control Release*, 2022, 343: 175-186.
- [17] Eguchi A, Feldstein AE. Extracellular vesicles in non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases[J]. *Liver Res*, 2018, 2(1): 30-34.
- [18] Park SH, Lee EK, Yim J, *et al.* Exosomes: nomenclature, isolation, and biological roles in liver diseases[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2023, 31: 253-263.
- [19] Castaño C, Novials A, Párrizas M. Exosomes from short-term high-fat or high-sucrose fed mice induce hepatic steatosis through different pathways[J]. *Cells*, 2022, 12(1): 169.
- [20] Lee J, Jeong I, Kim OK. Liver-derived exosomes induce inflammation and lipogenesis in mice fed high-energy diets[J]. *Nutrients*, 2022, 14(23): 5124.
- [21] Hughes A, Dahmus J, Rivas G, *et al.* Exercise training reverses gut dysbiosis in patients with biopsy-proven nonalcoholic steatohepatitis: a proof of concept study[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2021, 19(8): 1723-1725.
- [22] Chandrashekar V, Seth RK, Dattaroy D, *et al.* HMGB1-RAGE pathway drives peroxynitrite signaling-induced IBD-like inflammation in murine nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Redox Biol*, 2017, 13: 8-19.
- [23] Zhang BB, Zhao JN, Jiang MJ, *et al.* The potential role of gut microbial-derived exosomes in metabolic-associated fatty liver disease: implications for treatment[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 893617.
- [24] Chen P, Chen FC, Lei JX, *et al.* Gut microbial metabolite urolithin B attenuates intestinal immunity function *in vivo* in aging mice and *in vitro* in HT29 cells by regulating oxidative stress and inflammatory signalling[J]. *Food Funct*, 2021, 12(23): 11938-11955.
- [25] Gaskell H, Ge XD, Desert R, *et al.* Ablation of Hmgb1 in intestinal epithelial cells causes intestinal lipid accumulation and reduces NASH in mice[J]. *Hepatology*, 2020, 71(1): 92-108.