

TMAO通过激活NLRP3炎症小体在HCC发展中的作用

许 凤^{1*}, 王柱浩¹, 许婷婷¹, 段延勤¹, 王剑华^{2#}

¹大理大学临床医学院, 云南 大理

²大理大学第一附属医院, 云南 大理

收稿日期: 2025年2月15日; 录用日期: 2025年3月14日; 发布日期: 2025年3月27日

摘 要

目的: 探讨TMAO促进NLRP3炎症小体活化对小鼠肝癌进展的影响及其潜在机制。方法: 12只6~8周龄SPF级C57BL/6J小鼠, 通过肝内接种Hepa1-6细胞构建小鼠肝癌原位模型。随机分为对照组(NC组)与TMAO组, 每组6只。在接种后1周后, TMAO组予腹腔注射TMAO溶液, 对照组腹腔注射等体积的生理盐水, 期间记录小鼠体重变化。4周后分离并观察肝脏肿瘤大小及称取质量, 确定TMAO对小鼠肝脏肿瘤进展的影响。检测血清IL-1 β 、IL-18水平, HE染色观察肝组织病理变化, 实时荧光定量PCR (RT-PCR)检测肝组织NLRP3、Caspase-1及GSDMD的mRNA水平。结果: 小鼠原位肝癌模型构建成功。与对照组相比, TMAO促进了小鼠肝肿瘤生长($P < 0.05$), 血清IL-1 β 、IL-18水平升高($P < 0.05$), 肝组织NLRP3、Caspase-1及GSDMD的mRNA表达增强($P < 0.05$)。结论: TMAO通过NLRP3/GSDMD信号通路释放炎症因子, 促进肝癌进展。

关键词

氧化三甲胺, NLRP3炎症小体, 肝癌, 细胞焦亡

The Role of TMAO in the Development of HCC by Activating the NLRP3 Inflammasome

Feng Xu^{1*}, Zhuhao Wang¹, Tingting Xu¹, Yanqin Duan¹, Jianhua Wang^{2#}

¹School of Clinical Medicine, Dali University, Dali Yunnan

²The First Affiliated Hospital of Dali University, Dali Yunnan

Received: Feb. 15th, 2025; accepted: Mar. 14th, 2025; published: Mar. 27th, 2025

Abstract

Objective: To investigate the effect of TMAO on the progression of hepatocellular carcinoma (HCC)

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 许凤, 王柱浩, 许婷婷, 段延勤, 王剑华. TMAO 通过激活 NLRP3 炎症小体在 HCC 发展中的作用[J]. 生物医学, 2025, 15(2): 395-401. DOI: 10.12677/hjbm.2025.152046

in mice by promoting NLRP3 inflammasome activation and its underlying mechanisms. **Methods:** Twelve 6~8-week-old SPF-grade C57BL/6J mice were used to establish an orthotopic HCC model by intrahepatic inoculation of Hepa1-6 cells. The mice were randomly divided into a control group (NC group) and a TMAO group, with 6 mice in each group. One week after inoculation, the TMAO group was intraperitoneally injected with a TMAO solution, while the NC group received an equivalent volume of saline. Body weight changes were recorded during the experiment. Four weeks later, liver tumors were isolated, and their size and weight were measured to determine the effect of TMAO on tumor progression. Serum levels of IL-1 β and IL-18 were detected, and pathological changes in liver tissues were observed using HE staining. The mRNA levels of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD in liver tissues were measured by real-time quantitative PCR (RT-PCR). **Results:** The orthotopic HCC model was successfully established. Compared with the control group, TMAO promoted liver tumor growth ($P < 0.05$), increased serum levels of IL-1 β and IL-18 ($P < 0.05$), and enhanced the mRNA expression of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD in liver tissues ($P < 0.05$). **Conclusion:** TMAO promotes the progression of hepatocellular carcinoma by releasing inflammatory factors through the NLRP3/GSDMD signaling pathway.

Keywords

Trimethylamine Oxide, NLRP3 Inflammasomes, Hepatocellular Carcinoma, Pyroptosis

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

肝癌是全球癌症相关死亡的第三大原因,其发病率和死亡率正逐年上升。肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的肝癌类型,约占90%的病例[1]。HCC的发生是一个复杂、多步骤的过程,多种因素相互作用促进肝细胞恶性转化和HCC发展,约90%的HCC与病毒性肝炎、过量饮酒、脂肪肝引起的长期炎症有关[2]。NLRP3 (NOD-like receptor protein 3)炎症小体是一种多蛋白复合物,由NLRP3蛋白、凋亡相关斑点样蛋白(Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)和半胱天冬酶1前体(pro-Caspase-1)组成[3]。NLRP3炎症小体激活后活化的caspase-1一方面对gasdermin D (gasdermin蛋白家族成员, GSDMD)进行切割, GSDMD-N端在细胞膜上形成孔洞,引发焦亡;另一方面诱导白介素(Interleukin, IL)-1 β 和IL-18的前体活化为IL-1 β 及IL-18,均可通过GSDMD-N端域形成的通道释放,引发炎症反应[4]。有研究表明与正常肝组织相比, NLRP3相关基因在肝细胞癌中表达较低,且其基因表达程度与肝癌患者的生存显著相关[5], NLRP3炎症小体在HCC预后和免疫治疗中有潜在意义。此外,最近的一些研究表明,肠道代谢产物氧化三甲胺(Trimethylamine oxide, TMAO)与癌症发展的风险之间存在联系,原发性肝癌患者血浆TMAO水平显著升高[6]。TMAO通过多种途径激活NLRP3炎症小体[7][8],与炎症密切联系,但二者对HCC的作用机制仍需进一步研究。本研究通过建立小鼠原位肝癌模型,并腹腔注射TMAO溶液进行干预,检测NLRP3炎症小体的活化,探讨TMAO通过激活NLRP3炎症小体在HCC发生发展中的作用。

2. 材料和方法

2.1. 实验动物与细胞

SPF级C57BL/6J雄鼠,6~8周龄,体质量20~22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(许可证

编号: SYXK (滇) 2018-0002), 小鼠饲养于恒温、标准光照/黑暗循环和 60%湿度下饲养, 自由饮水和进食。于造模前随机将小鼠分成对照组与 TMAO 组, 每组 6 只。小鼠 Hepa1-6 细胞购自赛维爾生物科技有限公司。所有动物实验操作按照中国动物保护利用委员会发布的指导方针进行, 本研究经大理大学伦理委员会审核批准。

2.2. 药品与试剂

TMAO (sigma-aldrich); Hepa1-6 细胞专用完全培养基、胰蛋白酶(赛维爾生物科技有限公司); 小鼠白细胞介素 1 β (interleukin 1 β)、IL-18 ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司); 动物组织总 RNA 提取试剂盒、逆转录及 qPCR 试剂盒; 组织专用固定液(赛维爾生物科技有限公司), 组织包埋机、切片机及苏木素、伊红染液(大理大学第一附属医院病理科提供)。

2.3. 小鼠肝癌原位模型构建

Hepa1-6 细胞培养, 细胞处于对数生长期时重悬细胞, 将细胞浓度调整为每 10 μ l 10^6 个细胞, 以每只 20 μ l 原位接种于小鼠肝左叶。小鼠术前禁水粮 4 h, 称量每只小鼠体重, 按 0.25 mL/10g 体重腹腔注射阿弗丁麻醉后, 腹部切口暴露肝左外叶, 使用无菌注射器将细胞悬液 20 μ l 接种于肝左叶, 干棉球压迫止血后缝合肌肉和皮肤切口。

肝癌细胞移植后第 7 天开始, TMAO 组予腹腔注射 TMAO 溶液(80 mg/kg), 每周 4 次, 干预 3 周; 对照组腹腔注射 TMAO 组平均注射体积的生理盐水, 每 2 天记录一次小鼠体重变化。术后第 21 天, 眼球摘除术取血, 静置 2 h 后 4℃离心机 3000 rpm 离心 15 min, 取上层血清并冻存于-80℃冰箱。后脱颈处死小鼠, 解剖并分离出肝脏, PBS 冲洗干净, 吸干水后称量肝脏质量。留取部分肝组织固定于组织固定液中, 其余部分经液氮速冻后放入 80℃冰箱保存。

2.4. HE 染色

肝组织固定 2 天后从固定液中取出, 脱水后石蜡包埋, 切片, 行常规 HE 染色, 中性树胶封片, 400 倍光学显微镜下观察肝组织形态变化, 验证肝癌模型的构建。

2.5. ELISA

从-80℃冰箱取出小鼠冰冻血清, 冰上融解后用试剂盒中稀释液稀释 2 倍, 根据 ELISA 试剂盒说明书制备标准品, 将标准品与稀释后样本加到预包被酶标板中, 待反应结束后显色并在酶标仪 450 nm 波长处检测吸光值, 根据标准曲线及吸光值计算血清中 IL-1 β 、IL-18 水平。

2.6. qRT-PCR

称取约 50 mg 肝脏组织, 组织匀浆机震荡匀浆, 按照动物组织总 RNA 提取试剂盒说明书提取肝组织总 RNA, 使用分光光度计检测 RNA 样本浓度及纯度。根据样本 RNA 浓度计算逆转录所需的 RNA 体积, 按照逆转录试剂盒说明书配制 20 μ l 反应体系, 设置逆转录程序制备 cDNA。根据 qPCR 试剂盒说明书配制 20 μ l 反应体系, 进行 qRT-PCR 反应。以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析目的基因的相对表达水平。NLRP3 引物序列为正向: 5'-GCCGTCTACGTCTTCTTCCTTCC-3', 反向:

5'-CATCCGCAGCCAGTGAACAGAG-3'; caspase-1 引物序列为正向: 5'-AGGAGGGAATATGTGGG-3',

反向: 5'-AACCTTGGGCTTGTCTT-3'; GSDMD 引物序列为正向: 5'-TGCGTGTGACTCAGAAGACC-3',

反向: 5'-CAAACAGGTCATCCCCACGA-3'; β -actin 引物序列为正向:

5'-TATGCTCTCCCTCACGCCATCC-3', 反向: 5'-TGTAGCCACGCTCGGTCAGG-3'。

2.7. 统计学分析

采用 SPSS23.0 软件进行统计学分析, 正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验或 Kruskal-Wallis 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 小鼠一般情况比较

实验中后期, 两组小鼠开始出现精神萎靡, 活动与进食减少, 体重增加缓慢。与对照组比较, TMAO 组小鼠体重偏低, 体重增加速度明显低于对照组($P < 0.05$), 见图 1。其次, TMAO 组肝脏指数显著高于对照组($P < 0.05$), 见表 1。TMAO 组小鼠体重增长缓慢, 肝脏指数升高提示 TMAO 干预后加重了肝癌小鼠肿瘤的负荷。

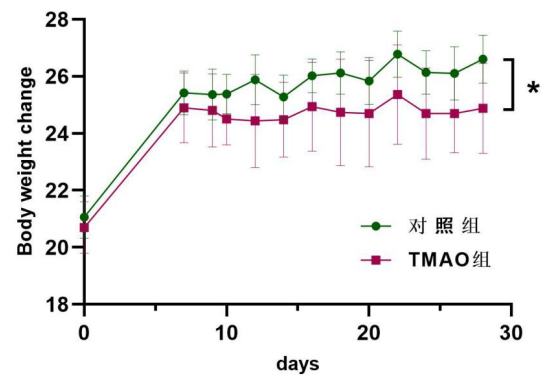


Figure 1. Weight changes curve in both groups of mice (* $P < 0.05$)
图 1. 两组小鼠体重变化曲线(* $P < 0.05$)

Table 1. Comparison of body weight, liver weight and liver index of the two groups of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) (* $P < 0.05$)

表 1. 两组小鼠体重、肝脏重量与肝指数比较($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) (* $P < 0.05$)

组别	体重(g)	肝脏重量(g)	肝脏指数(%)
对照组	26.6 $\pm$ 0.85	1.74 $\pm$ 0.30	6.2 $\pm$ 1.5*
TMAO 组	24.9 $\pm$ 1.5	1.98 $\pm$ 0.61	9.0 $\pm$ 1.2

3.2. 成功构建原位小鼠肝癌模型

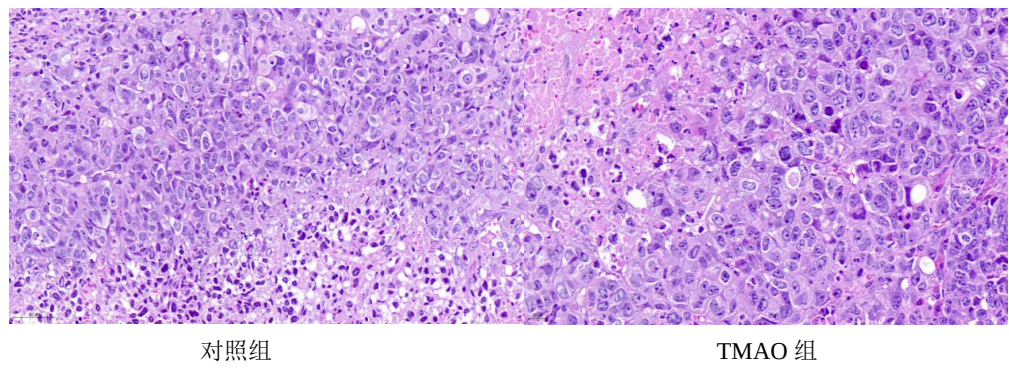


Figure 2. Pathological changes in liver tissues of two groups of mice (HE, 400 $\times$)
图 2. 两组小鼠肝组织病理变化(HE 染色, 400 $\times$)

HE 染色结果显示, 小鼠肝癌组织肿瘤细胞排列紊乱, 细胞核浆比例增高, 核染色深, 形态不规则, 可见较多胞核分裂象; 肝小叶结构明显破坏, 肝索排列紊乱; 局部见坏死区域, 坏死区边缘有大量炎性细胞浸润, 见图 2。HE 染色结果表明小鼠肝癌原位模型构建成功。

3.3. 肝组织中 NLRP3 炎症小体激活

RT-PCR 结果显示, 与对照组相比, TMAO 组小鼠肝癌组织中的 NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达水平显著增高($P < 0.05$), 见图 3。ELISA 检测进一步提示, TMAO 组小鼠血清中 IL-1 β 及 IL-18 水平也明显增加($P < 0.05$), 见图 4。结果表明 TMAO 可诱导肝癌小鼠 NLRP3 炎症小体活化, 并促进 IL-1 β 、IL-18 的成熟。

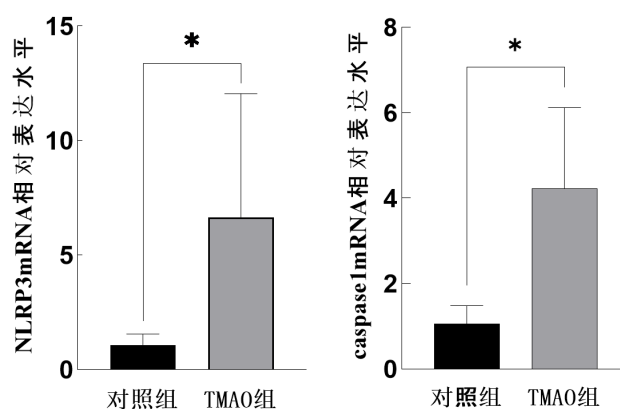


Figure 3. Relative expression levels of NLRP3 and Caspase-1 mRNA in liver cancer tissues of two groups of mice (* $P < 0.05$)
图 3. 两组小鼠肝癌组织中 NLRP3、Caspase-1 mRNA 相对表达水平(* $P < 0.05$)

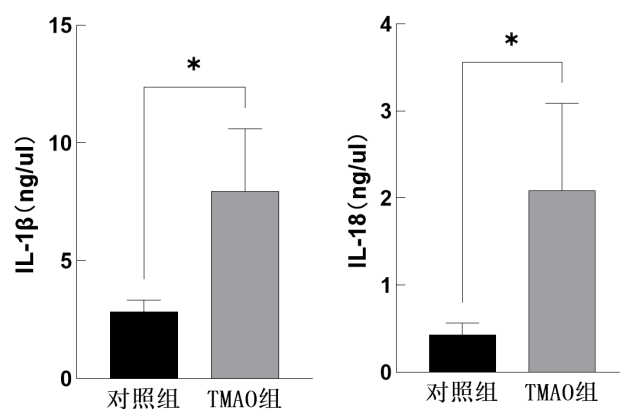


Figure 4. Comparison of serum IL-1 β and IL-18 levels in the two groups of mice (* $P < 0.05$)
图 4. 两组小鼠血清 IL-1 β 及 IL-18 水平比较(* $P < 0.05$)

3.4. TMAO 对肝癌小鼠肝癌组织中 GSDMD mRNA 表达的影响

GSDMD 作为焦亡相关蛋白家族的重要成员之一, 可被 caspase-1 裂解并进一步诱导细胞焦亡, 释放细胞内 IL-1 β 、IL-18 等炎症因子。为进一步了解 TMAO 激活 NLRP3 炎症小体后是否影响其下游基因 GSDMD 表达, 本研究检测了 GSDMD mRNA 表达情况。结果表明, TMAO 干预后同样增强了小鼠肝癌组织中 GSDMD mRNA 表达($P < 0.05$), 见图 5。结合上述实验中, 血清 IL-1 β 、IL-18 水平增加, 提示 TMAO 可通过 GSDMD 诱导细胞焦亡。

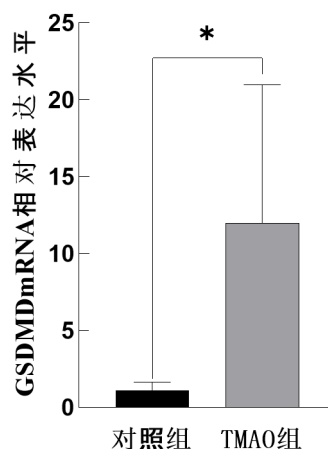


Figure 5. Relative expression level of GSDMD mRNA in liver cancer tissues of two groups of mice (* $P < 0.05$)
图 5. 两组小鼠肝癌组织中 GSDMD mRNA 相对表达水平(* $P < 0.05$)

4. 讨论

近年来,在多种恶性肿瘤中观察到肠道菌群紊乱,肠道菌群的紊乱通过多种途径导致肿瘤的易感性[9],其中肠道微生物及其代谢物可以参与肿瘤免疫微环境的调节,并已成为肿瘤生长的关键调节因子[10][11]。经由肠道菌群代谢而来的 TMAO 与原发性肝癌的发展呈正相关[12],但 TMAO 是肝癌的一个危险因素,还是肝癌患者肠道微生物群组成波动的生物标志物还需进一步验证。本研究通过原位注射肝癌细胞构建肝癌小鼠模型,结果表明 TMAO 干预后显著增加了肝癌小鼠的肿瘤负荷,这与临床研究中观察到的肝癌患者血清 TMAO 水平升高相一致。

炎症是癌症发生发展和进展的主要标志物,慢性和持续的炎症可损害肝细胞,导致纤维化和肝硬化,最终进展为肝癌[13]。NLRP3 炎症小体作为炎症核心,许多研究对其在 HCC 中的作用进行了研究,结果表明,NLRP3 炎症小体参与了 HCC 的肿瘤生长抑制和促进肿瘤生长[14]。究其原因,这可能是因为 NLRP3 炎症小体介导的不同信号通路导致的,一方面过量的炎性细胞因子可显著影响肿瘤微环境,最终促进 HCC 的生长[15][16];另一方面,NLRP3 炎症小体介导的焦亡可能抑制 HCC 的生长[17]。NLRP3 炎症小体在 HCC 中的作用取决于它主要作用于这两种机制中的哪一种。本研究发现,TMAO 通过激活 NLRP3 炎症小体,并诱导 GSDMD 介导细胞焦亡,释放大量炎症因子,如 IL-1 β 和 IL-18,最终表现为促进小鼠肝癌发展。可见当 TMAO 作为 NLRP3 炎症小体激活剂时,主要通过释放炎症因子,扩大炎症反应增加肝癌小鼠肿瘤负荷。

本研究首次将 TMAO-NLRP3-GSDMD 信号轴与肝癌进展联系起来,为理解 TMAO 的促癌机制提供了新的视角。然而,本研究仍存在一些局限性。首先,本研究仅在小鼠模型中验证了 TMAO 的促癌作用,仍需在临床样本中进一步验证 TMAO 水平与肝癌患者预后的关系。其次,本研究主要关注了 TMAO 对肝癌细胞本身的影响,而 TMAO 是否通过影响肿瘤微环境中的其他细胞,如免疫细胞、成纤维细胞等,间接促进肝癌进展,仍需在未来的研究中进一步探索。

基金项目

云南省教育厅科学研究基金(2024Y896)。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics

- 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Llovet, J.M., Kelley, R.K., Villanueva, A., Singal, A.G., Pikarsky, E., Roayaie, S., *et al.* (2021) Hepatocellular Carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, **7**, Article No. 6. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
 - [3] Cai, X., Chen, J., Xu, H., Liu, S., Jiang, Q., Halfmann, R., *et al.* (2014) Prion-like Polymerization Underlies Signal Transduction in Antiviral Immune Defense and Inflammasome Activation. *Cell*, **156**, 1207-1222. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.063>
 - [4] Li, Z., Ji, S., Jiang, M., Xu, Y. and Zhang, C. (2022) The Regulation and Modification of GSDMD Signaling in Diseases. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article 893912. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.893912>
 - [5] Dai, B., Cao, H., Hu, Y., Gong, Z., Huang, X., Chen, Y., *et al.* (2023) Role of NLRP3 Inflammasome Activation in HCC Cell Progression. *Heliyon*, **9**, e19542. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19542>
 - [6] Liu, Z., Tan, X., Li, Q., Liao, G., Fang, A., Zhang, D., *et al.* (2018) Trimethylamine N-Oxide, a Gut Microbiota-Dependent Metabolite of Choline, Is Positively Associated with the Risk of Primary Liver Cancer: A Case-Control Study. *Nutrition & Metabolism*, **15**, Article No. 81. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0319-2>
 - [7] Fang, Q., Zheng, B., Liu, N., Liu, J., Liu, W., Huang, X., *et al.* (2021) Trimethylamine N-Oxide Exacerbates Renal Inflammation and Fibrosis in Rats with Diabetic Kidney Disease. *Frontiers in Physiology*, **12**, Article 682482. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.682482>
 - [8] Yang, G. and Zhang, X. (2022) Trimethylamine N-Oxide Promotes Hyperlipidemia Acute Pancreatitis via Inflammatory Response. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **100**, 61-67. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2021-0421>
 - [9] Xie, Y. and Liu, F. (2024) The Role of the Gut Microbiota in Tumor, Immunity, and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, **15**, Article 1410928. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1410928>
 - [10] Wang, H., Rong, X., Zhao, G., Zhou, Y., Xiao, Y., Ma, D., *et al.* (2022) The Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide Promotes Antitumor Immunity in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Metabolism*, **34**, 581-594.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.02.010>
 - [11] Mirji, G., Worth, A., Bhat, S.A., El Sayed, M., Kannan, T., Goldman, A.R., *et al.* (2022) The Microbiome-Derived Metabolite TMAO Drives Immune Activation and Boosts Responses to Immune Checkpoint Blockade in Pancreatic Cancer. *Science Immunology*, **7**, eabn0704. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abn0704>
 - [12] Banerjee, R., Wehrle, C.J., Wang, Z., Wilcox, J.D., Uppin, V., Varadharajan, V., *et al.* (2024) Circulating Gut Microbe-Derived Metabolites Are Associated with Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines*, **12**, Article 1946. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12091946>
 - [13] Marrero, J.A., Kulik, L.M., Sirlin, C.B., Zhu, A.X., Finn, R.S., Abecassis, M.M., *et al.* (2018) Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, **68**, 723-750. <https://doi.org/10.1002/hep.29913>
 - [14] Tang, Y., Tao, Y., Zhu, L., Shen, J. and Cheng, H. (2023) Role of NLRP3 Inflammasome in Hepatocellular Carcinoma: A Double-Edged Sword. *International Immunopharmacology*, **118**, Article 110107. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110107>
 - [15] Liu, B., Zhou, Z., Jin, Y., Lu, J., Feng, D., Peng, R., *et al.* (2022) Hepatic Stellate Cell Activation and Senescence Induced by Intrahepatic Microbiota Disturbances Drive Progression of Liver Cirrhosis toward Hepatocellular Carcinoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **10**, e003069. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003069>
 - [16] Xiao, C., Gong, J., Jie, Y., Liang, W., Tai, Y., Qin, W., *et al.* (2023) E2F1-Mediated Up-Regulation of NCAPG Promotes Hepatocellular Carcinoma Development by Inhibiting Pyroptosis. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, **12**, 25-35. <https://doi.org/10.14218/jcth.2022.00292>
 - [17] Liu, C., Wu, J., Li, Z., Huang, X., Xie, X. and Huang, Y. (2024) Cinobufotalin Inhibits Proliferation, Migration and Invasion in Hepatocellular Carcinoma by Triggering NOX4/NLRP3/GSDMD-Dependent Pyroptosis. *Frontiers in Oncology*, **14**, Article 1438306. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1438306>