DOI:10.16016/j.2097-0927.202205095

RANKL 在小鼠肝纤维化形成中抑制肝星状细胞的活化

周丽佳[1],钟 立[2],薛 倩[3],邓 亮[3],黄 璐[1] 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地,儿童感染免疫重庆市重点实验室[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院消化内科[2];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院消化内科[3]

[**摘要**] **目的** 探讨核因子-κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)在小鼠肝星状细胞(hepatic stellate cells,HSCs)活化及肝纤维化进程中的生物学作用。**方法** 将 26 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6 鼠随机分为(n=13):肝纤维化造模组[按照 5 μL/g 腹腔注射体积分数 10%的四氯化碳(carbon tetracholoride,CCL_4)油剂溶液,2 次/周诱导小鼠肝纤维化]和对照组(同时注射等体积的无菌油剂)。6 周后通过 RT-qPCR、IHC 和 Western blot 等方法检测肝组织、原代肝细胞(hepatocyte,HC)和 HSCs 中的 RANKL,α-平滑肌动蛋白(α-SMA)和Ⅰ型胶原(Collagen-Ⅰ)的 mRNA 及蛋白表达水平。用不同浓度外源性重组 RANKL 细胞因子培养原代 HSCs,采用 RT-qPCR 和 IF 分别检测各组 RANKL、α-SMA 和 Collagen-Ⅰ mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 造模组小鼠肝组织中 RANKL 的 mRNA 和蛋白表达水平显著增高(P<0.05),且蛋白表达呈弥散分布;对照组小鼠体内,RT-qPCR 和 Western blot 结果均显示 HC 的 RANKL mRNA 和蛋白表达水平高于在 HSCs 中的表达水平(P<0.001),且在 CCL_4 诱导小鼠肝纤维化后,HC 的 RANKL 表达水平进一步升高,而 HSCs 的 RANKL 表达水平出现下降;在体外刺激原代 HSCs 活化时加入不同浓度的 RANKL 重组细胞因子后,与对照组相比,加入重组 RANKL 后的 HSCs 在活化过程中 RANKL、α-SMA 和 Collagen-Ⅰ mRNA 和蛋白表达水平均降低(P<0.05 或 P<0.01 或 P<0.001),且有剂量依赖性。**结论** 在小鼠肝纤维化的进程中,HC 表达大量 RANKL,而 RANKL 可抑制 HSCs 的活化。

[**关键词**] RANKL;肝星状细胞;肝纤维化

[**中图法分类号**] R322.47; R341; R363.21 [**文献标志码**] A

RANKL inhibits activation of hepatic stellate cells during hepatic fibrosis in mice

ZHOU Lijia[1], ZHONG Li[2], XUE Qian[3], DENG Liang[3], HUANG Lu[1] [1]Institute of Pediatrics, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, China-International Science and Technology Cooperation Base for Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [2]Deppartment of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [3]Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the biological role of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) in the activation of hepatic stellate cells (HSCs) and the process of hepatic fibrosis. **Methods** Twenty-six male C57BL/6 mice (6~8 weeks old) were randomly assigned to control group and liver fibrosis group (n=13). The mice in the latter group were injected intraperitoneally with 5 μL/g 10%

[**基金项目**] 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxmX0215)

[**通信作者**] 黄 璐,E-mail:huanglu_86oct@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

carbon tetracholoride (CCL_4, twice/week) to induce liver fibrosis, while those of the former group were given same volume of sterile oil solution. In 6 weeks later, the expression of RANKL, α-SMA and Collagen-Ⅰ at mRNA and protein levels in liver tissue, primary hepatocytes (HCs) and HSCs was detected by quantitative real-time PCR (RT-qPCR), immunohistochemical assay and Western blotting, respectively. After primary HSCs were treated with different concentrations of exogenous recombinant RANKL, the mRNA and protein levels of above molecules were measured with RT-qPCR and immunofluorescence assay. **Results** The mRNA and protein levels of RANKL were significantly increased in the liver tissue from the model group than the control group ($P<0.05$), and the protein was in a diffuse distribution. In the control mice, the mRNA and protein levels of RANKL was obviously higher in HCs than HSCs ($P<0.001$), while CCL_4 treatment induced liver fibrosis resulted in the expression level of RANKL was further increased in HCs, while decreased in HSCs. After different concentrations of recombinant RANKL were added to stimulate the activation of primary HSCs, the expression of RANKL, α-SMA and Collagen-Ⅰ at mRNA and protein levels in HSCs activated by recombinant RANKL was decreased in a dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$ or $P<0.001$). **Conclusion** In the process of liver fibrosis in mice, HCs express a large amount of RANKL, and RANKL can inhibit the activation of HSCs.

[**Key words**] RANKL; hepatic stellate cells; liver fibrosis

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX0215). Corresponding author: HUAGN Lu, E-mail: huanglu_86oct@163.com

肝纤维化是肝脏在各种有害刺激的作用下诱发的损伤修复反应,其实质为细胞外基质(extracellular matrix,ECM)在肝内的大量沉积,常见于大多数慢性肝病的病理过程[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cells,HSCs)是肝组织中ECM的主要来源,并且HSCs激活并转化为肌成纤维母细胞(myofibroblast,MFB)是肝纤维化发生的中心环节[2]。HSCs是肝组织中的一种间质细胞,约占肝脏细胞总数的10%。HSCs激活是指其从非增殖的静止状态向有增殖能力、可表达α-平滑肌蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)、ECM和多种细胞因子的MFB转变的过程[3]。HSCs的活化受TGF-β、IL-17、IL-22、hedgehog配体和CXCL10等多种细胞因子的调控,这些细胞因子主要来源于肝脏中肝细胞(hepatocyte,HC)、巨噬细胞、kuffer细胞等[4]。核因子-κB受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand,RANKL)是一种肿瘤坏死因子,与TNFSF成员TRAIL、FasL和TNF-α具有同源性[5]。在骨骼系统中,RANKL能够与功能受体RANK和OPG结合,是破骨细胞形成的关键调节因子[6-8]。在免疫系统中,活化的T细胞所表达的RANKL与树突状细胞表面的RANK相结合后可调控T细胞及树突状细胞的功能[9]。

目前,关于RANKL的研究主要集中在骨骼稳态、免疫耐受和癌症等方面,其在肝脏中的作用并不明确。近期有研究报道,原发性胆管炎患者的肝脏门脉区可能通过聚集大量高表达RANKL的免疫细胞进而促进固有免疫的发生[10]。另外,有报道发现患有骨质疏松症并伴有非酒精性脂肪肝的患者在使用RANKL抗体治疗后肝炎症状得到了改善[11]。在小鼠肝脏中,RANKL主要表达于HC,实验证明受损的肝细胞内能够快速产生大量RANKL细胞因子,并维持较长时间[12]。但RANKL在肝纤维化中的作用尚不清楚。本研究主要通过对比对照组小鼠和肝纤维化造模组小鼠肝脏组织和原代HC、HSCs中RANKL表达变化,并进一步研究RANKL对HSCs活化的影响,从而探讨RANKL通过调节HSCs影响肝纤维化的形成。

1 材料与方法

1.1 实验对象

6~8周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠26只,体质量18~22 g,由重庆医科大学动物中心提供,饲养于重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所动物中心独立通气饲养笼中。所有小鼠以标准饲料,自由摄食、饮水。动物饲养条件符合实验动物管理条例,所有动物相关操作遵循国家及重庆医科大学动物中心有关动物伦理规定及条例。

1.2 主要试剂与仪器

SP免疫组化试剂盒购自于武汉博士德生物技术有限公司,Ⅳ型胶原酶、DNA酶Ⅰ、链蛋白酶、天狼星红染色试剂购自于北京索莱宝公司,optiprep分离液购自于苏格兰Axis-shied公司,总RNA提取试剂盒购自于无锡百泰克生物技术有限公司,cDNA反转录试剂

盒、荧光定量 PCR 检测试剂盒购自于宝生物医药科技有限公司,全蛋白提试剂盒购自于南京凯基生物科技有限公司,抗 α-SMA 抗体、抗 Collagen-Ⅰ抗体均购自美国 abcam 公司,抗 GAPDH 抗体购自于美国 BBI life science 公司,抗 RANKL 抗体、重组 sRANKL 细胞因子购自于美国 Proteintech 公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体、HRP 标记兔抗鼠 IgG 抗体购自于美国 Cell Signaling Technology 公司,激光共聚焦显微镜购自于日本尼康公司,光学显微镜、显微照相系统购自于日本 Olympus 公司。

1.3 肝纤维化小鼠造模

本研究采用经典的四氯化碳(carbon tetracholoride,CCL_4)诱导小鼠肝纤维化的模型进行实验:将小鼠随机分为对照组和造模组($n=13$)。按照 5 μL/g 向造模组小鼠腹腔注射体积分数 10% 的 CCL_4 油剂溶液,2 次/周;同时向对照组小鼠注射等体积的无菌油剂。

1.4 原代 HC 的分离和原代 HSCs 分离及培养

1.4.1 HC 的分离 6 周后,小鼠麻醉后处死,用含有 IV 型胶原酶的 DMEM 溶液消化肝脏,获得含有肝脏各种类型细胞的细胞悬液,在 4 ℃,50 g,5 min 条件下离心后弃上清,剩余细胞团块为质量较大的肝细胞,用 DMEM 重悬后备用。

1.4.2 HSCs 的分离及培养 按照 1.4.1 获得肝脏细胞悬液,再通过 70% optiprep 分离液梯度离心(24 ℃,1 600×g,20 min)和选择性黏附后得到纯度较高的原代 HSCs。离心后培养基重悬细胞团块备用。细胞培养:将分离得到的原代 HSCs 使用含有 2% 胎牛血清、2% 的 100 μg/mL 的青-链霉素的高糖 DMEM 培养基,在 37 ℃,5%CO_2 条件下培养。静息状态的肝星状细胞是圆形的富含脂质小滴、并且有网状纤维包绕的细胞;而随着肝星状细胞的活化,细胞的胞体逐渐增大,胞突伸展。细胞质中脂滴消失,VitA 含量减少。胞质内粗面内织网、高尔基体发达,并具有旺盛的蛋白质合成能力[13]。研究提取原代 HSCs 培养后,通过对其细胞形态进行观察,将原代 HSCs 体外培养 1 天为静息状态 HSCs,培养 3 天为部分活化状态 HSCs,培养 5 天为完全活化状态 HSCs[14-15]。

1.5 天狼星红染色及免疫组化技术(immunohistochemistry,IHC)染色

天狼星红染色:小鼠处死后分离肝脏,取肝脏相同部位以 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片后脱蜡水化,接着进行天狼星红-苦味酸饱和溶液染色、脱水,最后中性树脂封片后观察拍照。免疫组化染色:组织固定切片等步骤同前,在脱蜡水化后,进行高温下抗原修复、过氧化氢去除酶;接着山羊血清封闭孵育后滴加目的蛋白抗体 4 ℃过夜,复温后滴加辣根过氧化物酶标记的二抗孵育。最后滴加 DAB 显色,苏木精复染后中性树胶封片后拍照观察。

1.6 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,RT-qPCR)检测

RNA 试剂盒提取组织或细胞的总 RNA,按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。扩增条件为:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 20 s,60 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 30 min,循环 33 次,72 ℃检测信号。设置 3 个复孔,记录每孔的 CT 值,以 3 个复孔的平均值作为最终结果。本研究中以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行分析。引物序列如下:mRANKL:5′-CAGCATCGCTCTGTTCCTGTA-3′(上游),5′-CTGCGTTTTCATGGAGTCTCA-3′(下游);Collagen-Ⅰ:5′-TGGCGGTTATGACTTCAGCTT-3′(上游),5′-CTCAAGGTCACGGTCACGAAC-3′(下游);α-SMA:5′-GATCTCTATGCTAACAACGTCCTG-3′(上游),5′-CTTCGTCGTATTCCTGTTTGC-3′(下游);GAPDH:5′-AACACGGAAGGCCATGCCAG-3′(上游),5′-TGCATCCTGCACCACCAACT-3′(下游)。

1.7 Western blot

按照蛋白提取试剂盒说明书提取组织或细胞的总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度后,经凝胶电泳、硝酸纤维素膜印迹后,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h。而后将膜转移至含目的蛋白抗体的稀释液(稀释比例均为 1∶1 000)中,于 4 ℃孵育过夜。再用 TBST 洗涤 3 次后,将膜置于相应的辣根过氧化物酶标记二抗稀释液中常温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次。最后用 ECL 化学发光试剂显影。

1.8 免疫荧光(immunofluorescence,IF)检测

提取原代 HSCs 于装有共聚焦玻片的培养皿中,在 37 ℃,5% CO_2 条件下加入含有不同浓度 RANKL 的 DMEM 培养基进行培养 72 h,固定后使用 0.5% Triton X-100 透膜 10 min、PBS 洗 2 次,5% 牛血清白蛋白溶液常温封闭 30 min;而后将玻片转移至含目的蛋白抗体的稀释液(稀释比例为 1∶1 000)中,于 4 ℃避光孵育过夜,PBS 洗 3 次后,加入荧光二抗(稀释比例为 1∶10 000)室温避光孵育 60 min,DAPI 染核室温避光孵育 15 min,最后抗荧光淬灭剂封片在倒置荧光显微镜观察并收集图像。

1.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 软件对研究数据进行统计分析,组间差别采用两独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

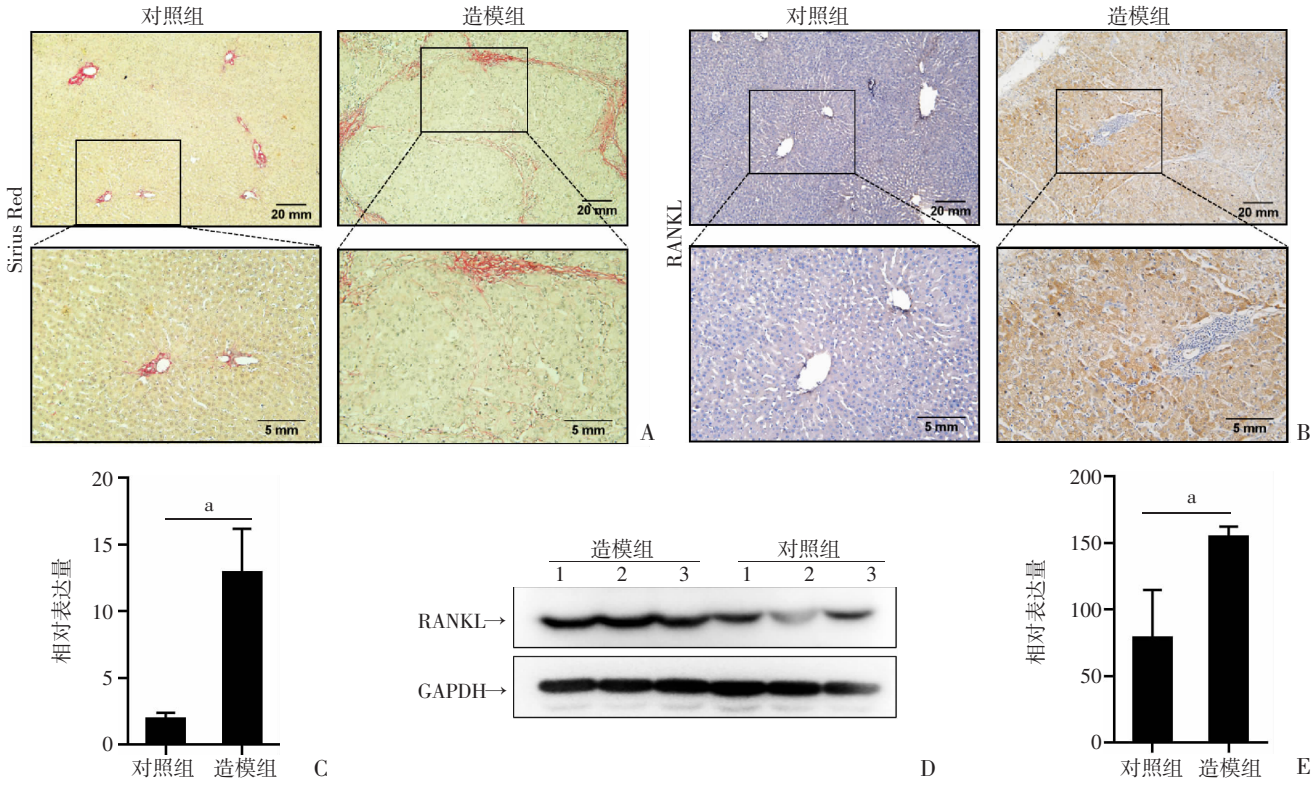
2.1 RANKL 在肝纤维化过程中的表达

天狼星红油染色可看到造模组小鼠肝组织中胶原纤维明显增多,发生了明显的肝纤维化(图 1A)。IHC 染色显示小鼠肝组织中 RANKL 表达明显增强,且染色区弥散分布于肝组织中(图 1B)。RT-qPCR 结果显示造模组肝组织中 RANKL mRNA 表达水平增高($P<0.05$,图 1C)。Western Blot 结果显示:较之对照组,造模组小鼠肝组织中 RANKL 蛋白表达也显著增高(图 1D、E)。这提示 RANKL 在肝纤维化的发生发展中发挥了作用。

2.2 在小鼠肝纤维化过程中,肝细胞分泌大量 RANKL

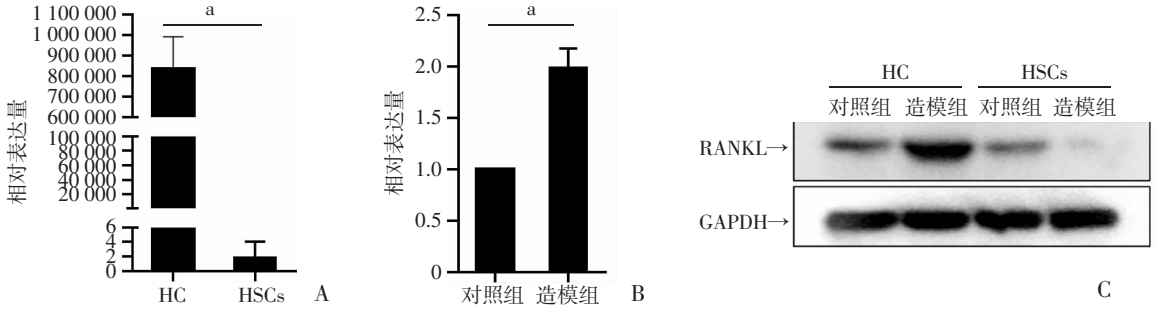
细胞因子 RANKL 在细胞中合成后可分泌至细胞外发挥功能,本研究免疫组化结果也显示在肝组织中 RANKL 呈弥散性分布。为明确肝组织中分泌 RANKL 的细胞类型,研究提取对照组小鼠原代 HC 和 HSCs,RT-qPCR 检测细胞中 RANKL 的 mRNA 表达显示:对照组小鼠体内 RANKL 的 mRNA 在 HC 中的表达量远高于其在 HSCs 中的表达水平,Western blot 结果表明 RANKL 的蛋白表达水平呈现出同样的趋势(图 2A、B)。可见对照组小鼠的肝组织中 RANKL 主要由 HC 分泌。

研究提取 2 组小鼠的原代 HC,通过 RT-qPCR 检测其 mRANKL 表达,结果显示造模组小鼠原代 HC 中 RANKL 的 mRNA 表达水平明显高于对照组(图 2B),Western blot 检测 HC 中 RANKL 的蛋白表达变化也与其 mRNA 变化趋势一致(图 2C),表明与对照组小鼠相比,肝纤维化小鼠原代 HC 分泌的 RANKL 明显增加。Western blot 结果还显示:与对照组小鼠相比,RANKL 在肝纤维化小鼠的原代 HSCs 中的表达有下降的趋势。证明在对照组小鼠体内,与 HSCs 相比,RANKL 主要由 HC 分泌,而肝纤维化病变会导致 HC 中的 RANKL 进一步增高,与此相反的是肝纤维化过程中 HSCs 表达 RANKL 的水平有下降趋势。



a:$P<0.05$ A:天狼星红染色评估肝纤维化程度;B:免疫组化检测 RANKL 表达情况;C:RT-qPCR 检测 RANKL mRNA 表达水平;D、E:Western blot 检测 RANKL 蛋白表达情况和相对表达量

图 1 免疫组化、RT-qPCR、Western blot 检测实验小鼠肝组织 RANKL mRNA 和蛋白表达 ($n=6,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.001$ A:对照组 HC 和 HSCs 中 RANKL mRNA 相对表达量;B:2 组小鼠 HSCs 中 RANKL mRNA 相对表达量;C:2 组小鼠 HC 和 HSCs 中 RANKL 蛋白表达

图 2 RT-qPCR、Western blot 检测实验小鼠 HC 和 HSCs RANKL mRNA 和蛋白表达 ($n=12, \bar{x}\pm s$)

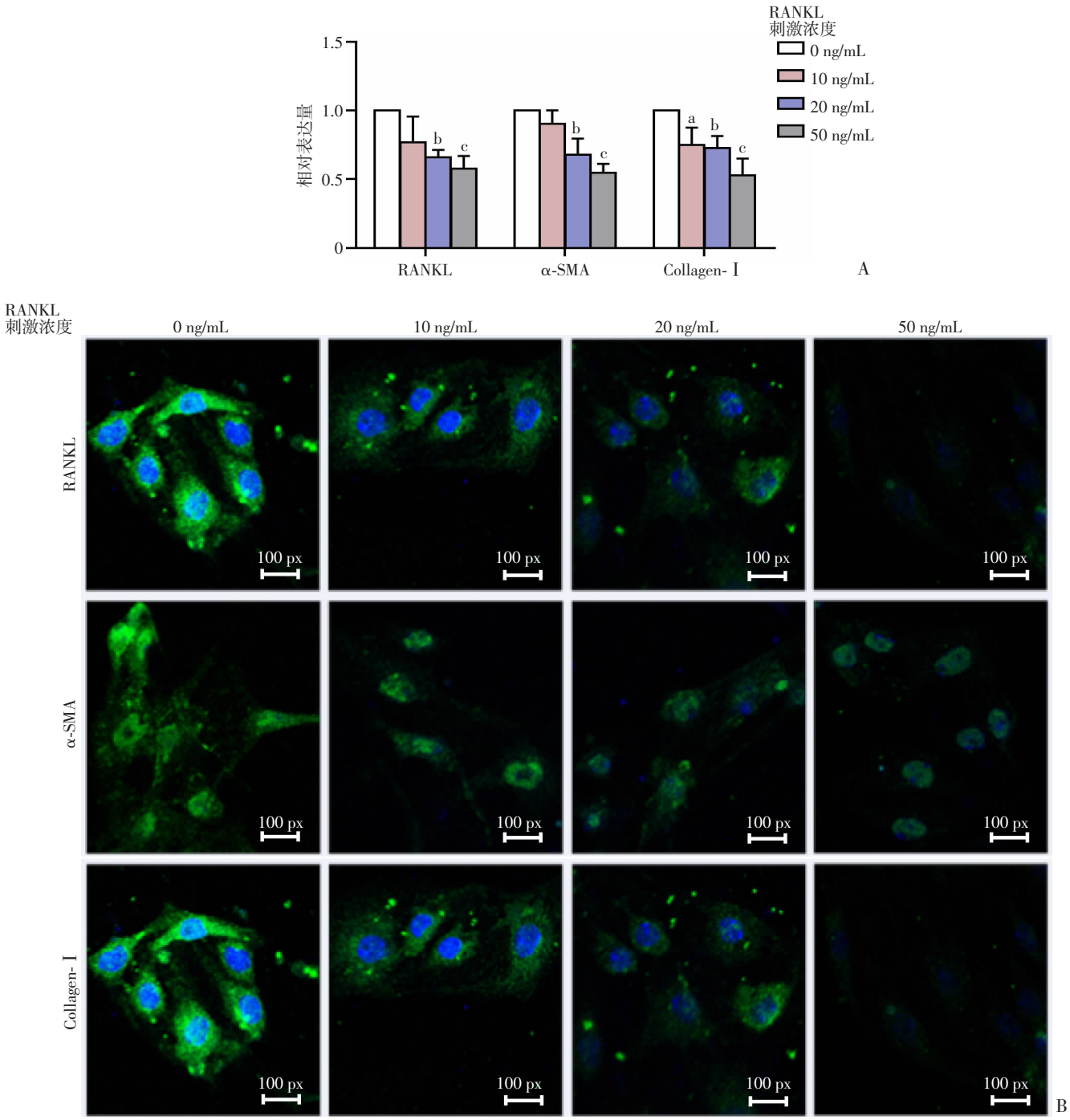
2.3 RANKL 抑制原代 HSCs 的活化

研究采用外源性 RANKL 刺激原代 HSCs 来模拟小鼠体内肝纤维化过程中大量 RANKL 对 HSCs 的影响。经不同浓度的 RANKL 重组细胞因子刺激原代 HSCs,检测培养 72 h 后的 HSCs 中 RANKL、α-SMA 和 Collagen-Ⅰ的表达水平。RT-qPCR 结果显示,与对照组相比,RANKL 刺激后的 HSCs 中 RANKL、α-SMA 和 Collagen-Ⅰ的 mRNA 表达水平均下降,且具有剂量依赖性(图 3A),随着加入 RANKL 浓度增高 HSCs 中活化相关蛋白表达水平逐渐降低。同样,研究采用免疫荧光检测 RANKL 刺激原代 HSCs 72 h 后细胞中 RANKL、α-SMA 和 Collagen-Ⅰ蛋白的表达,随着 RANKL 浓度增加,蛋白的荧光强度均显示出明显下降(图 3B),说明 RANKL 以剂量依赖的方式下调原代 HSCs 中 RANKL、α-SMA 和 Collagen-Ⅰ mRNA 和蛋白的表达水平;提示 RANKL 可抑制 HSCs 的活化。

3 讨论

肝纤维化是一个由慢性肝损伤引起的复杂的纤维化和炎症过程,代表了肝硬化进展的早期阶段。HSCs 主要定位于肝窦内皮细胞和 HC 之间的窦周间隙,是启动纤维化过程的肌成纤维细胞和门脉成纤维细胞的主要来源。活化的 HSCs 可以分泌细胞外基质、金属蛋白酶组织抑制剂和基质金属蛋白酶等物质导致肝脏结构重塑[16]。目前认为肝移植是治疗肝硬化的理想方法,但这并不适用于绝大多数患者。因此,抗肝纤维化治疗仍需进一步研究。

近年来,越来越多的文献表明 RANKL 与肝纤维化之间存在着紧密联系。在我们前期研究中发现在非酒精性脂肪肝发生过程中,肝脏组织中 RANKL 的 mRNA 和蛋白表达增加,且与其疾病发展程度正相关[13],由此我们推测 RANKL 在肝纤维化过程中可能促进 HSCs 的活化。有文献报道,在小鼠肝脏缺血前或再灌注时给予 RANKL 治疗,其 HC 中核因子 κB(nuclear factor kappa B,NF-κB)的活性明显增加[12],而 NF-κB 能通过 TLR 信号传导途径参与 HSCs 的激活而促进肝纤维化[17-18],同时也能募集肝脏 kuffer 细胞的聚集并释放炎症因子活化 HSCs[13]。由此我们猜想 RANKL 可能通过参与 HSCs 活化影响肝纤维化形成。通过实验我们发现,用 CCL_4 诱导的肝纤维化小鼠的肝脏组织中 RANKL mRNA 和蛋白表达水平均明显增加,这验证了我们的猜测 RANKL 参与了在肝纤维化的发生发展进程。有文献表明在对照组小鼠体内 RANKL 主要来源于肝组织中的 HC [12],与此同时,我们还发现 RANKL 在纤维化模型小鼠肝脏的原代 HC 中表达会进一步增高,但在原代 HSCs 中却呈现下降趋势,二者变化的差异促使我们进一步探究 HC 大量表达的 RANKL 对于 HSCs 的活化是否有影响。因此,我们在体外刺激活化原代 HSCs 时加入大量的外源性重组 RANKL,由此来模拟并研究体内肝纤维化进程中 RANKL 对 HSCs 的影响。我们发现不同浓度的体外 RANKL 重组细胞因子刺激均能够抑制 HSCs 的活化,并且随着体外刺激 RANKL 重组细胞因子浓度的增高,原代 HSCs 中 RANKL 的 mRNA 和蛋白表达水平逐渐下降,具有一定的浓度依赖性,这表明高浓度的 RANKL 抑制了 HSCs 中 RANKL 的表达。同时我们还发现 HSCs 活化的标志物 α-SMA 和 Collagen-Ⅰ的 mRNA 和蛋白表达水平与 RANKL 具有相似的变化趋势,这表明大量的 RANKL 直接作用于 HSCs 将导致 HSCs 的活化受到阻碍,同时 HSCs 细胞本身 RANKL 的表达亦出现下降。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$, 与 0 ng/mL 比较

A:RT-qPCR 检测 mRNA 相对表达量;B:IF 检测蛋白表达

图 3 RT-qPCR、IF 检测原代 HSCs 经 RANKL 刺激培养 72 h RANKL、α-SMA、Collagen-Ⅰ mRNA 和蛋白表达
($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

综上所述,在肝纤维化进程中 RANKL 在肝脏组织中表达增加且与纤维化程度正相关,而 RANKL 在 HC 中表达增高却在 HSCs 中表达下降,体外实验中外源性 RANKL 不仅能够抑制 HSCs 中 RANKL 的表达,还能在一定程度上抑制 HSCs 的活化进程。由此,我们认为在肝纤维化进程中,受损的 HC 既能够高表达 TGF-β、IL-1A、hedgehog 配体和 CXCL10 等这些促进肝纤维化进程的细胞因子[4],同时也能分泌如 RANKL 能够直接抑制肝星状细胞活化的细胞因子,这为我们进一步了解肝纤维化机制和肝纤维化的治疗提供了新的思路。

参考文献:

[1] DUVAL F, MORENO-CUEVAS J E, GONZÁLEZ-GARZA M T, *et al*. Liver fibrosis and mechanisms of the protective action of medicinal plants targeting inflammation and the immune response[J]. Int J Inflam, 2015, 2015: 943497. DOI: 10.1155/2015/943497.

[2] VAN DIJK F, HAZELHOFF C M, POST E, *et al*. Design of a gene panel to expose the versatile role of hepatic stellate cells in human liver fibrosis[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(3): 278. DOI: 10.3390/pharmaceutics12030278.

[3] TSUCHIDA T, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(7): 397-411. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.38.

[4] KOYAMA Y, BRENNER D A. Liver inflammation and fibrosis[J]. J Clin Invest, 2017, 127(1): 55-64. DOI: 10.1172/JCI88881.

[5] WONG B R, JOSIEN R, LEE S Y, *et al*. TRANCE (tumor necrosis factor[TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor[J]. J Exp Med, 1997, 186(12): 2075-2080. DOI: 10.1084/jem.186.12.2075.

[6] WALSH M C, CHOI Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond[J]. Front Immunol, 2014, 5: 511. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00511.

[7] LACEY D L, TIMMS E, TAN H L, *et al*. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation[J]. Cell, 1998, 93(2): 165-176. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81569-x.

[8] VIDELA L A, TAPIA G, RODRIGO R, *et al*. Liver NF-κB and AP-1 DNA binding in obese patients[J]. Obesity, 2009, 17(5): 973-979. DOI: 10.1038/oby.2008.601.

[9] TAT S K, PELLETIER J P, VELASCO C R, *et al*. New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target?[J]. Keio J Med, 2009, 58(1): 29-40. DOI: 10.2302/kjm.58.29.

[10] LLEO A, BIAN Z, ZHANG H, *et al*. Quantitation of the rank-rankl axis in primary biliary cholangitis[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0159612. DOI: 10.1371/journal.pone.0159612.

[11] TAKENO A, YAMAMOTO M, NOTSU M, *et al*. Administration of anti-receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) antibody for the treatment of osteoporosis was associated with amelioration of hepatitis in a female patient with growth hormone deficiency: a case report[J]. BMC Endocr Disord, 2016, 16(1): 66. DOI: 10.1186/s12902-016-0148-0.

[12] SAKAI N, VAN SWERINGEN H L, SCHUSTER R, *et al*. Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice[J]. Hepatology, 2012, 55(3): 888-897. DOI: 10.1002/hep.24756.

[13] FAOUZI S, LE BAIL B, NEAUD V, *et al*. Myofibroblasts are responsible for collagen synthesis in the stroma of human hepatocellular carcinoma: an *in vivo* and *in vitro* study[J]. J Hepatol, 1999, 30(2): 275-284. DOI: 10.1016/s0168-8278(99)80074-9.

[14] ZHONG L, YUAN J H, HUANG L, *et al*. RANKL is involved in Runx2-triggered hepatic infiltration of macrophages in mice with NAFLD induced by a high-fat diet[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 6953421. DOI: 10.1155/2020/6953421.

[15] LI Y J, CHEN Y Y, HUANG H Y, *et al*. Autophagy mediated by endoplasmic Reticulum stress enhances the caffeine-induced apoptosis of hepatic stellate cells[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(5): 1405-1414. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3145.

[16] REN J J, HUANG T J, ZHANG Q Q, *et al*. Insulin-like growth factor binding protein related protein 1 knockdown attenuates hepatic fibrosis via the regulation of MMPs/TIMPs in mice[J]. Hepatobil Pancreat Dis Int, 2019, 18(1): 38-47. DOI: 10.1016/j.hbpd.2018.08.008.

[17] SEKI E, DE MINICIS S, ÖSTERREICHER C H, *et al*. TLR4 enhances TGF-β signaling and hepatic fibrosis[J]. Nat Med, 2007, 13(11): 1324-1332. DOI: 10.1038/nm1663.

[18] HE X, PU G B, TANG R, *et al*. Activation of nuclear factor kappa B in the hepatic stellate cells of mice with schistosomiasis Japonica[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104323. DOI: 10.1371/journal.pone.0104323.

(收稿:2022-05-17;修回:2022-09-18)

(编辑 邓强庭)