DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000888

TIMP-1 siRNA 对肝纤维化大鼠 TIMP-1 及胶原表达的影响

张 燕，郎 清，石小枫，刘 杞，孙 航
（重庆医科大学附属第二医院感染科、教育部感染性疾病分子生物学重点实验室，重庆 400010）

【摘 要】**目的**：探讨基质金属蛋白酶抑制因子-1（tissue inhibitor of metalloproteinases-1，TIMP-1）的 siRNA 经体内转染后对 CCl_4 诱导的肝纤维化大鼠 TIMP-1 及胶原表达的影响。**方法**：将 32 只雄性 SD（Sprague Dawley）大鼠随机分为 4 组：正常组、模型组、TIMP-1 siRNA 处理组和 TIMP-1 siRNA 阴性对照组。CCl_4 皮下注射诱导大鼠肝纤维化模型，共 12 周。HE 染色验证肝纤维化程度，免疫组织化学染色检测 TIMP-1 和Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达；Western blot 检测 TIMP-1 的蛋白表达，qRT-PCR 法检测TIMP-1 和Ⅰ、Ⅲ型胶原的 mRNA 表达。**结果**：病理组织学显示相较模型组、阴性对照组，肝组织肝纤维化程度在 TIMP-1 siRNA 处理组中明显减轻。TIMP-1 和Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达量也明显减少（P=0.000）。**结论**：TIMP-1 siRNA 能抑制或阻断 TIMP-1 表达，进而促进以Ⅰ、Ⅲ型胶原为主的细胞外基质的降解，肝纤维化程度得到改善，对 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化有一定的防治效果。

【关键词】基质金属蛋白酶抑制因子 1；小干扰 RNA；肝纤维化；基因治疗
【中图分类号】R575.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-07-19

Effect of TIMP-1 siRNA on the expression of TIMP-1 and collagen in rats with liver fibrosis

Zhang Yan, Lang Qing, Shi Xiaofeng, Liu Qi, Sun Hang
(*Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases Founded by Ministry of Education*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and type Ⅰ, Ⅲ collagen in carbon tetrachloride (CCl_4)- induced liver fibrosis rats treated with small interference RNA (siRNA) targeting TIMP-1. ***Methods***: A total of 32 male SD (Sprague Dawley) rats were randomly and averagely divided into 4 groups: normal group, model group, TIMP-1 siRNA treatment group (0.25 mg/kg), TIMP-1 siRNA negative control group (0.25 mg/kg). CCl_4 was used for 12 weeks to induce liver fibrosis. All rats were then sacrificed to collect liver tissue samples. A portion of the liver samples was soaked in formalin for testing the degree of liver fibrosis by hematoxylin-eosin staining. The expression of TIMP-1 and type Ⅰ, Ⅲ collagen was detected by immuno histochemical staining. TIMP-1 protein expression was detected by Western blot and TIMP-1 mRNA expression and type Ⅰ, Ⅲ collagen was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. ***Results***: Compared with those in model group and negative control group, the tissue of liver in TIMP-1 siRNA treatment group has normal structure, with a small number of inflammatory cell infiltrating, and there is no obvious proliferation of collagen fibers. Immunohistochemistry showed the protein expressions of TIMP-1 and type Ⅰ, Ⅲ collagen were decreased significantly. Western blot showed the protein expression of TIMP-1 was decreased significantly. Real-time PCR showed that the mRNA expression of TIMP-1, type Ⅰ collagen and type Ⅲ collagen were decreased significantly. ***Conclusion***: TIMP-1 siRNA can inhibit the expression of TIMP-1, and can effectively prevent the occurrence and development of liver fibrosis induced by CCl_4 in rats. The mechanism is the down-regulation of TIMP-1 expression can promote extracellular matrix degradation.

【Key words】tissue inhibitor of metalloproteinase-1; small interfering RNA; liver fibrosis; gene therapy

作者介绍：张 燕，Email：zykxclv@163.com，
研究方向：病毒性肝炎及肝硬化的研究和治疗。
通信作者：石小枫，Email：sxf7776@163.com。
基金项目：国家自然科学基金面上资助项目（编号：81270503）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160318.1151.016.html
（2016-03-18）

肝纤维化是肝脏应对各种急慢性损伤后，如酒精、病毒感染、胆汁淤积和代谢性疾病，形成的创伤愈合反应，现认为其可以逆转[1-2]。目前认为肝脏细胞外基质（extracellular matrix，ECM）合成增加降解受阻，肝内基质持续堆积，是导致肝纤维化发展的主要机制[3-4]。研究表明，肝星状细胞（hepatic stellate cell，HSC）在肝纤维化的发生、发展中起主要作用[5]。活化、增殖的 HSC 既是肝损伤后 ECM 的主要来源，也是调控基质代谢的 MMP/TIMP 的重要因素[6-10]。激活的肝星状细胞可增强基质金属蛋白酶抑制因子-1（tissue inhibitor of metalloproteinases-1，TIMP-1）的表达，使肝脏 ECM 无法及时降解形成堆积，进而导致肝纤维化甚至肝硬化的发生。所以，抑制纤维化肝脏中基质金属蛋白酶抑制因子（tissue inhibitor of metalloproteinases，TIMP）的表达，可作为防治肝纤维化的手段之一。

小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）以带有专一性的方式调节基因的表达，已成为研究基因功能与药物目标的一项重要工具[11]。在前期研究工作中成功构建了 TIMP-1 的 siRNA，在体外实验中验证了其转染效率，并对 HSC 表达 TIMP-1有明显的抑制作用[12]。本研究是在体外实验的前提下对 TIMP-1 siRNA 的抗纤维化作用进行深入探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 重组质粒 psi-TIMP-1、psi-HK 均由前期工作成功构建[12]。

1.1.2 实验动物 SD 大鼠，♂，SPF 级，平均体质量（160~210）g。重庆医科大学实验动物中心提供（许可证编号：SYXK2012-0001）。

1.1.3 实验试剂 RNA 提取试剂盒（北京百泰克生物技术有限公司）；RNA 逆转录试剂盒和 real-time PCR 试剂盒（大连 TaKaRa 公司）；TIMP-1 兔多克隆抗体（美国 Santa Cruz 公司）；Type Ⅰ Collagen 抗体、Type Ⅲ Collagen 抗体、抗 β-肌动蛋白（β-actin）抗体和山羊抗兔-HRP 二抗（武汉博士德生物工程有限公司）；ECL 化学发光液（南京凯基生物科技有限公司）；VECTASTAIN ABC 免疫组化试剂盒（北京嘉美纽诺生物科技有限公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 肝纤维化动物模型的建立与处理 SD 大鼠 32 只，雄性，体质量 160~210 g，随机分为 4 组：正常组、模型组、TIMP-1 siRNA 处理组和 TIMP-1 siRNA 阴性对照组，每组 8 只。大鼠肝纤维化模型通过皮下注射 40% CCl_4 建立；首次剂量 3.0 ml/kg，维持剂量 1.0 ml/kg；同时用高压水动力法从大鼠尾静脉分别按 0.25 mg/kg 体质量注射阴性对照质粒、TIMP-1 siRNA 质粒，正常组与模型组注射相同体积无菌生理盐水，共 12 周（2 次/周）。12 周后处死动物。部分肝组织用 4%多聚甲醛固定，另一部分转移至液氮中保存，备用。

1.2.2 肝组织病理学观察 第 12 周末，水合氯醛（10%）腹腔注射麻醉，解剖各组大鼠，取肝脏组织。每组留取少许肝组织固定于 4%多聚甲醛溶液中，制备 4 μm 石蜡切片，进行苏木精-伊红染色，对于每个组织样本进行肝纤维化分级。根据 Ishak 改良分级系统将肝纤维化分为 0~6 个等级[13]。2 名经验丰富的病理科专家评估各组染色结果。

1.2.3 免疫组织化学染色 石蜡切片脱蜡水化。3%过氧化氢溶液室温孵育除去内源性过氧化物酶；枸橼酸盐缓冲液高温修复；山羊血清封闭；分别滴加一抗（TIMP-1 抗体：1:50；Ⅰ型胶原抗体：1:60；Ⅲ型胶原抗体：1:60）50 μl，滴加相同倍数 0.01 mol/L PBS 作为阴性对照，4 ℃ 过夜。次日孵生物素标记的二抗，VECTASTAIN® ABC 免疫组化试剂盒进行免疫组化染色检测抗原抗体反应。免疫组化半定量分析采用 IPP5.0 软件对组织中相关蛋白的阳性表达颗粒的平均光密度值（IOD/Area）进行测定。

1.2.4 Western blot 法检测 TIMP-1 蛋白的表达 匀浆冻存的各组肝脏组织标本，16 000 r/min 离心 5 min，吸取上清并转移至新的离心管中。BCA 法对总蛋白质进行定量，蛋白样品（50 μg）经 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至 PVDF 膜上，5% BSA 的 TBST 封闭。TIMP-1 一抗（1:500），4 ℃孵育过夜。室温孵育辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG（H+L）（1:2 000）1 h，ECL 显色。测定蛋白信号强度并以管家基因 β-actin 作为标准化内参，相对定量（特异性基因光密度值/管家基因光密度值）用 Quantity One 4.6.2 图像分析软件完成。

1.2.5 qRT-PCR 法检测肝组织中 TIMP-1 和Ⅰ、Ⅲ型胶原 mRNA 的表达 各组大鼠肝组织 RNA 采用总 RNA 提取试剂盒提取。紫外分光光度计测定 RNA 纯度和浓度，根据逆转录试剂盒说明书将 1 μg RNA 逆转录合成 cDNA，SYBR 荧光标记，PCR 反应在 ABI7300 荧光实时定量 PCR 仪（Roche 公司 德国）上进行。取 GAPDH 为内参照，PCR 引物（TIMP-1 上游：5'-ACAGGTTTCCGGTTCGCCTAC-3'，下游：5'-CTGCAGGCAGTGATGTGCAA-3'；Ⅰ型胶原上游：5'-CATCTCCATGGCCTCTGCAA-3'；下游：5'-CACATGTGTGGCCGATGTTTC-3'；Ⅲ型胶原上游：5'-TGGACAGATGCTGGTGCTGAG-3'；下游：5'-GAAGGCCAGCTGTACATCAAGGA-3'；GAPDH 上游：5'-TGAT TCTACCCACGGCAAGTT-3'；下游：5'-TGATGGGTTTCCCATTGATGA-3'），由大连宝生生物有限公司设计并合成。PCR 反应参数：95 ℃预变性 10 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 31 s，40 个循环。增加溶解曲线步骤：95 ℃ 15 s，60 ℃ 60 s，95 ℃ 15 s。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法来计算 mRNA 的相对含量，△CT=CT（目

的基因）-CT（内参基因 GAPDH），△△CT=△CT（实验组）-△CT（正常组），$2^{-\triangle\triangle CT}$ 表示实验组目的基因 mRNA 表达相对于对照组的变化倍数。

1.3 统计学处理

用 SPSS 17.0 进行统计分析。计量资料经正态性检验后符合正态分布，用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多样本均数比较用单因素方差分析，其任意两组间的两两比较采用 LSD-t 法；肝纤维化病理分级结果采用构成比表示，采用 Kruskal-Wallis 检验。检验水准 α=0.05。

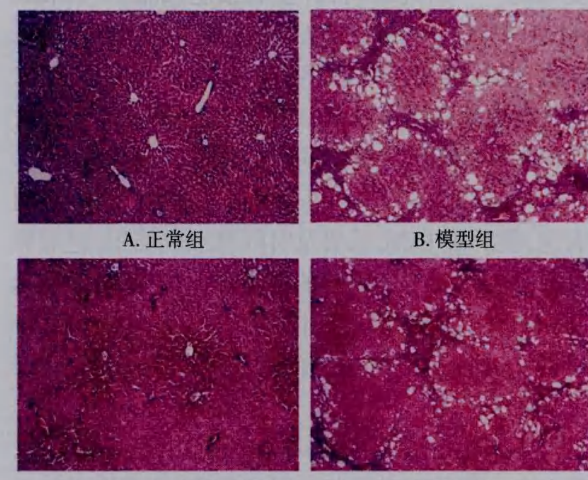
2 结 果

2.1 肝脏组织病理分析

H&E 染色结果表明：相较正常组，模型组、阴性对照组大鼠肝小叶正常结构消失，肝细胞呈广泛脂肪变性、坏死，炎症细胞浸润，尤以汇管-中央静脉区为甚，肝组织内纤维组织增生，有典型的假小叶结构形成（见图 1A、1B、1D）；与模型组及阴性对照组相比，TIMP-1 siRNA 处理组肝小叶结构的破坏程度明显减轻，存留部分完整的小叶结构，可见程度较轻的肝细胞脂肪变性，少量纤维间隔以及较少量炎症细胞浸润（见图 1C）。根据 Ishak 改良分级系统显示：TIMP-1 siRNA 处理组肝纤维化评分较模型组及阴性对照组低（见表 1）。

2.2 免疫组织化学检测结果

免疫组织化学染色检测了 TIMP-1、Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原的表达，其阳性细胞的平均光密度值见表 2。免疫组化结果显示，正常组几乎无 TIMP-1 阳性细胞表达。与 TIMP-1 siRNA 处理组相比，模型组、阴性对照组 TIMP-1 均呈强阳性表达（P=0.000）。模型组及阴性对照组中Ⅰ、Ⅲ型胶原阳性染色程度均明显增强，主要定位于汇管区，而经 TIMP-1 siRNA 干预后，Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达均下调（P=0.000）（见表 2，图 2~4）。



A. 正常组　B. 模型组　C. TIMP-1 siRNA 处理组　D. 阴性对照组

图 1 大鼠肝组织 HE 染色（100×）

Fig.1 Photomicrographs and HE staining of rat liver sections (100×)

2.3 Western blot 法检测 TIMP-1 蛋白的表达

Western blot 结果显示：正常组、模型组、TIMP-1 siRNA

表 1 大鼠肝纤维化病理学分级

Tab.1 Stage of hepatic fibrosis in rats

组别	0级	Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级	Ⅳ级	Ⅴ级	Ⅵ级	总计
正常组	8	0	0	0	0	0	0	8
模型组	0	0	0	0	1	1	6	8^{a}
TIMP-1 siRNA 处理组	0	2	4	2	0	0	0	8^{abc}
阴性对照组	0	0	0	0	1	3	4	8^{ad}

注：总卡方检验：χ^2 = 27.702，P=0.000，正常组 vs. 模型组：χ^2=13.690，a：P=0.000；正常组 vs. TIMP-1 siRNA 处理组：χ^2=13.151，a：P=0.000；正常组 vs. 阴性对照组：χ^2=13.196，a：P=0.000；模型组 vs. TIMP-1 siRNA 处理组：χ^2=12.133，b：P=0.000；TIMP-1 siRNA 处理组 vs. 阴性对照组：χ^2=11.743，c：P=0.000；模型组 vs. 阴性对照组：χ^2=0.729，d：P=0.393

表 2 免疫组化染色检测大鼠肝组织 TIMP-1 和Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达（$\bar{x} \pm s$）

Tab.2 Immunohistochemical staining for TIMP-1 and type Ⅰ, Ⅲ collagen in rat liver（$\bar{x} \pm s$）

组别	TIMP-1	Ⅰ型胶原	Ⅲ型胶原
正常组	125.830 ± 35.592	150.310 ± 34.861	160.250 ± 20.337
模型组	457.390 ± 60.872^{ab}	658.560 ± 36.406^{ab}	633.830 ± 79.216^{ab}
TIMP-1siRNA处理组	209.920 ± 64.528^{a}	254.920 ± 75.061^{a}	277.380 ± 75.105^{a}
阴性对照组	479.630 ± 25.731^{ab}	682.230 ± 76.461^{ab}	634.560 ± 83.804^{ab}
F 值	76.879	128.130	74.161
P 值	0.000	0.000	0.000

注：免疫组化结果半定量分析采用 IPP5.0 软件测定组织中相关蛋白的阳性表达颗粒的平均光密度值（IOD）；与正常组比较 a：P=0.000；与 TIMP-1 siRNA 处理组比较 b：P=0.000

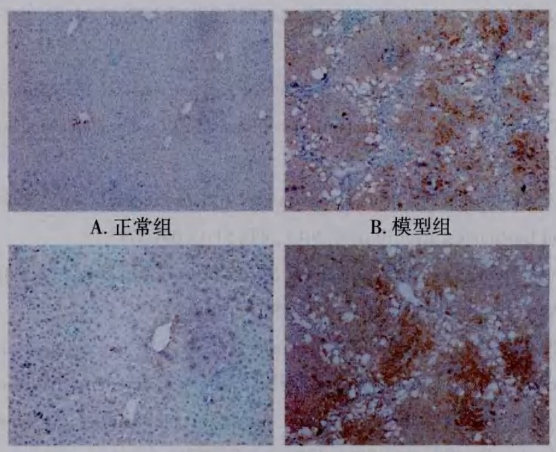


图 2 免疫组化染色检测大鼠肝组织 TIMP-1 的表达（200×）

Fig.2 Immunohistochemical staining for TIMP-1 in rat liver (200×)

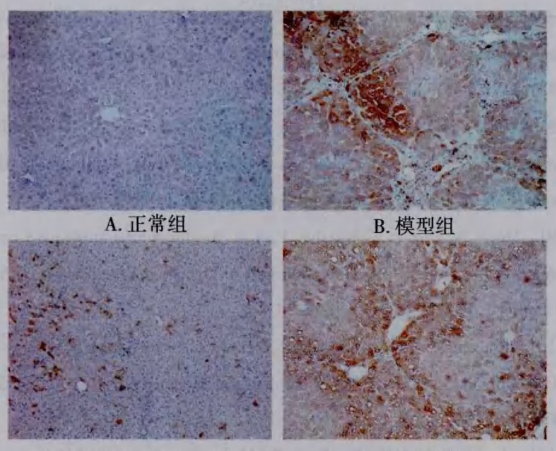


图 3 免疫组化染色检测大鼠肝组织Ⅰ型胶原的表达（200×）

Fig.3 Immunohistochemical staining for type Ⅰ collagen in rat liver (200×)

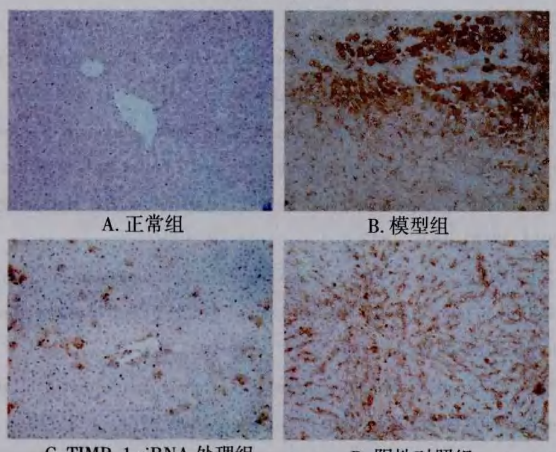


图 4 免疫组化染色检测大鼠肝组织Ⅲ型胶原的表达（200×）

Fig.4 Immunohistochemical staining for type Ⅲ collagen in rat liver (200×)

处理组及阴性对照组 TIMP-1 的表达分别为：0.33 ± 0.01、1.32 ± 0.48、0.60 ± 0.10、1.14 ± 0.23。方差分析结果显示差异有统计学意义（F=17.020，P=0.000）。相较正常组，其他 3 组 TIMP-1 蛋白的表达均上调（P=0.000）。与模型组及阴性对照组相比，TIMP-1 siRNA 处理组中 TIMP-1 蛋白的表达明显降低（P=0.000）（见图 5）。

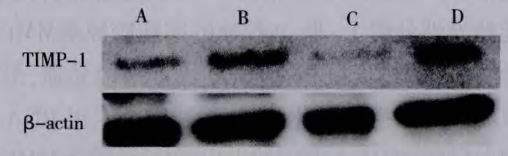


图 5 Western blot 法检测 TIMP-1 蛋白的表达

Fig.5 TIMP-1 protein expression detected by Western blot

2.4 qRT-PCR 检测各组 TIMP-1 和Ⅰ、Ⅲ型胶原 mRNA 的表达

正常组、模型组、TIMP-1 siRNA 处理组及阴性对照组中 TIMP-1 和Ⅰ、Ⅲ型胶原的 mRNA 的表达量见表 3。以正常组的 mRNA 水平为对照。两两比较结果显示：与正常组相比，其余各组肝组织 TIMP-1 和Ⅰ、Ⅲ型胶原转录水平均明显升高（P=0.000），与模型组及阴性对照组相比，TIMP-1 siRNA 处理组中 TIMP-1 和Ⅰ、Ⅲ型胶原 mRNA 表达均明显下降（P=0.000）（见表 3）。

表 3 qRT-PCR 检测大鼠 TIMP-1 和Ⅰ、Ⅲ型胶原 mRNA 的表达（$\bar{x} \pm s$）

Tab.3 TIMP-1 and type Ⅰ, Ⅲ collagen expression in rats detected by qRT-PCR（$\bar{x} \pm s$）

组别	TIMP-1	Ⅰ型胶原	Ⅲ型胶原
正常组	1	1	1
模型组	7.390 ± 0.769^{ab}	8.690 ± 0.401^{ab}	7.160 ± 0.784^{ab}
TIMP-1siRNA处理组	2.920 ± 0.736^{a}	3.570 ± 0.415^{a}	2.190 ± 0.869^{a}
阴性对照组	7.870 ± 0.875^{ab}	8.460 ± 0.601^{ab}	6.950 ± 1.21^{ab}
F 值	143.000	494.000	86.500
P 值	0.000	0.000	0.000

注：a，与正常组比较，P=0.000；b：与 TIMP-1 siRNA 处理组比较，P=0.000

3 讨 论

肝纤维化是由数种原因共同作用而引起的导致慢性肝损害的病理改变，表现为肝内细胞外基质成分沉积量失衡[2,14]，并损害肝脏的正常功能，是慢性肝病最终发展为肝硬化的必经阶段。研究表明，HSC 是肝纤维化的关键介导环节[15]。肝损伤后，HSC 非正常活化与增殖，并进一步发生表型转化而发展为肌成纤维细胞；过量表达 α-SMA，分泌大量纤维

化过程中的基质成分，包括胶原、糖蛋白及蛋白多糖等；合成、分泌 TIMPs，抑制基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMPs）活性，细胞非基质合成、降解因此失衡[5,16-17]，致使肝纤维化形成。肝组织中的 TIMP-1 主要由 HSC 分泌，它能结合 MMPs 以降低其表达活性。肝脏损伤后，TIMP -1 表达增加，特别是与能特异性分解Ⅰ、Ⅲ型胶原的间质胶原酶MMP-1结合，使胶原过度沉积，肝小叶正常结构受损，最终形成纤维化乃至肝硬化。因此，利用小干扰 RNA 技术靶向敲除 TIMP-1 基因的表达，以此消除其对MMPs的抑制作用，从而促 ECM 降解，构建起抑制 TIMP-1 表达的基因载体，并使其以较高浓度集聚于肝脏内，最终达到减轻甚至逆转肝脏组织纤维化程度、避免肝硬化的效果。

本实验利用 CCl_4 皮下注射成功建立了大鼠肝纤维化模型，高压水动力法尾静脉注射 TIMP-1 siRNA 进行干预治疗。制备各组大鼠病理切片，根据 Ishak 改良分级系统对肝纤维化严重程度进行了量化分析，以此验证 TIMP-1 siRNA 防治肝纤维化的效果。通过免疫组织化学方法、Western blot 和 qRT-PCR 等方法，对Ⅰ、Ⅲ型胶原及其 TIMP-1 蛋白的表达进行了检测，在分子水平上观察了 TIMP-1 siRNA 对肝组织纤维化程度以及 TIMP-1 表达的影响。

病理学观察显示，相较模型组和阴性对照组，TIMP-1 siRNA 处理组的大鼠肝脏炎症细胞浸润以及坏死的比例、肝脏内纤维组织增生程度以及假小叶的形成量均呈明显降低的趋势。免疫组织化学和 qRT-PCR 检测显示 TIMP-1 siRNA 处理组的 TIMP-1 和Ⅰ、Ⅲ型胶原含量较模型组及阴性对照组明显下降（P=0.000）。另外，Western blot 检测蛋白 TIMP-1 的表达量也较模型组及阴性对照组呈现出了明显下降的趋势（P=0.000），但高于正常组表达（P=0.000）。

本研究显示，TIMP-1 siRNA 能对 TIMP-1 的表达起明显抑制作用，且能减少Ⅰ、Ⅲ型胶原的产生，促进 ECM 降解，最终延缓肝纤维化的发生和发展，可作为防治肝硬化的重要靶点。

参 考 文 献

[1] Povero D, Busletta C, Novo E, et al. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process[J]. Histol Histopathol, 2010, 25(8): 1075-1091.

[2] Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(S2): 65-68.

[3] Fallowfield JA. Therapeutic targets in liver fibrosis[J]. Am J Physiol Gastrointest liver Physiol, 2011, 300(5): G709-G715.

[4] Hernandez Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Annu Rev Pathol, 2011(6): 425-456.

[5] Fowell AJ, Collins JE, Duncombe DR, et al. Silencing tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) with short interfering RNA reveals a role for TIMP-1 in hepatic stellate cell proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(2): 277-282.

[6] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Gastroenterology, 2008, 134(6): 1655-1669.

[7] Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis[J]. J Immunol, 2007, 178(8): 5288-5295.

[8] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases? 1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse[J]. Hepatology, 2002, 36(4 Pt 1): 850-860.

[9] Moles A, Tarrats N, Morales A, et al. Acidic sphingomyelinase controls hepatic stellate cell activation and in vivo liver fibrogenesis[J]. AM J Pathol, 2010, 177(3): 1214-1224.

[10] Pinzani M, Macias-Barragan J. Update on the pathophysiology of liver fibrosis[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 4(4): 459-472.

[11] Inoue A, Sawata SY, Taira K. Molecular design and delivery of siRNA[J]. J Drug Target, 2006, 14(7): 448-455.

[12] 钱克莉，徐 宁，郎 清，等. 转化生长因子 β1 及基质金属蛋白酶抑制剂 1、2siRNA 真核表达载体的构建与鉴定[J]. 中华肝脏病杂志，2011，19(4)：291-296.

[13] Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases[J]. J Hepatol, 2007, 47(4): 598-607.

[14] Zhao J, Zhang Z, Luan Y, et al. Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment[J]. Hepatology, 2014, 59(4): 1331-1342.

[15] Zhang F, Lu C, Xu W, et al. Curcumin raises lipid content by Wnt pathway in hepatic stellate cell[J]. J Surg Res, 2015[Epub ahead of print]. doi:10.1016/jss.2015.08.040.

[16] Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. Physiol Rev, 2008, 88(1): 125-172.

[17] Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story[J]. Gut, 2015, 64(5): 830-841.

（责任编辑：冉明会）