



中国组织工程研究
Chinese Journal of Tissue Engineering Research
ISSN 2095-4344, CN 21-1581/R

《中国组织工程研究》网络首发论文

题目: 鹿茸干细胞来源外泌体调控 NF- κ B 信号通路预防小鼠酒精性肝损伤
作者: 王东旭, 任晶, 李吉萍, 王玉俗, 胡鹏飞, 张国坤, 李春义
网络首发日期: 2022-11-21
引用格式: 王东旭, 任晶, 李吉萍, 王玉俗, 胡鹏飞, 张国坤, 李春义. 鹿茸干细胞来源外泌体调控 NF- κ B 信号通路预防小鼠酒精性肝损伤[J/OL]. 中国组织工程研究. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1581.R.20221119.2214.002.html>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

鹿茸干细胞来源外泌体调控 NF- κ B 信号通路预防小鼠酒精性肝损伤

王东旭¹, 任 晶^{1, 2}, 李吉萍¹, 王玉俗^{1, 2}, 胡鹏飞¹, 张国坤¹, 李春义^{1, 2}

https://doi.org/10.12307/2023.674

投稿日期：2022-08-31

采用日期：2022-10-12

修回日期：2022-10-28

中图分类号：

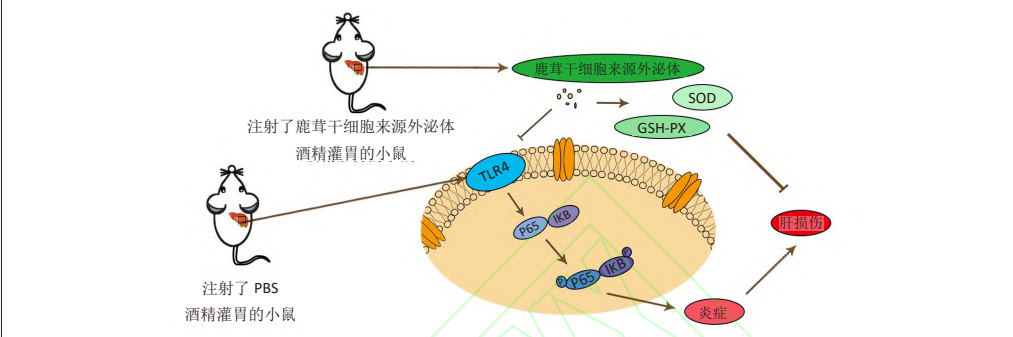
R459.9; R318; R575

文章编号：

2095-4344(2023)00-00000-07

文献标识码：A

文章快速阅读：鹿茸干细胞来源外泌体通过调控 NF- κ B 信号通路预防肝损伤



文题释义：

鹿茸干细胞：鹿茸是目前发现的唯一在失去后还能够周期性完全再生的哺乳动物器官；在快速生长期，鹿茸的生长速度可达2.75 cm/d，研究发现是鹿茸尖部的间充质细胞快速分裂导致了鹿茸超速生长。作者所在团队前期研究发现，鹿茸间充质细胞兼具胚胎干细胞和成体干细胞双重属性，所以定义其为鹿茸干细胞。

外泌体：是指细胞分泌的小膜泡(30–150 nm)，其主要来源于细胞内溶酶体微粒内陷形成的多囊泡体，经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中。外泌体中含有多种蛋白质、miRNA、长链非编码RNA、DNA和脂质体等成分，由于其特殊结构可通过胞吞进入细胞，在细胞间的通讯中发挥着关键作用。

摘要

背景：过度的酒精摄入会导致诸多的肝脏疾病，然而目前尚无有效的防治药物。前期研究发现鹿茸干细胞能够显著改善肝纤维化，推测其治疗作用可能是通过旁分泌效应产生的。

目的：研究鹿茸干细胞的主要旁分泌物质——外泌体对小鼠急性肝损伤的预防作用及其机制。

方法：40只C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组、骨髓间充质干细胞外泌体预防组、鹿茸干细胞外泌体预防组，每组10只。2个外泌体预防组连续7 d给予相应外泌体进行干预，模型组给予PBS干预，然后给予体积分数为50%的酒精(15 mL/kg)灌胃1次建立急性酒精性肝损伤模型。灌胃后24 h，计算肝指数、检测肝损伤及氧化还原指标、评价肝组织病理病变、检测炎症因子和NF- κ B信号通路相关基因的表达水平。

结果与结论：①鹿茸干细胞来源外泌体显著减轻了肝损伤的程度，包括改善体质量、降低血清中谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平、改善肝组织病理病变、促进肝实质细胞增殖分裂以及提高抗氧化水平(谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶水平升高，丙二醛水平降低)，且效果强于骨髓间充质干细胞来源外泌体；②进一步研究发现，鹿茸干细胞来源外泌体显著降低了肝组织中白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的mRNA表达水平，以及NF- κ B信号通路相关基因(p65、p-p65、IKB和p-IKB)的蛋白表达水平；③这说明鹿茸干细胞来源外泌体能够起到保护肝脏的作用，减轻酒精所造成的肝损伤，其作用的发挥可能是通过靶向抑制NF- κ B信号通路实现的。

关键词：鹿茸干细胞；外泌体；酒精性肝损伤；炎症；NF- κ B信号通路

Deer antler stem cell-derived exosomes prevent alcoholic liver injury via modulating nuclear factor kappa B signaling pathway in mice

Wang Dongxu¹, Ren Jing^{1, 2}, Li Jiping¹, Wang Yusu^{1, 2}, Hu Pengfei¹, Zhang Guokun¹, Li Chunyi^{1, 2}

¹Changchun Sci-Tech University, Changchun 130116, Jilin Province, China; ²College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China

Wang Dongxu, Master, Associate researcher, Changchun Sci-Tech University, Changchun 130116, Jilin Province, China

Corresponding author: Li Chunyi, Professor, Changchun Sci-Tech University, Changchun 130116, Jilin Province, China; College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China

Co-corresponding author: Zhang Guokun, Associate researcher, Changchun Sci-Tech University, Changchun 130116, Jilin Province, China

¹长春科技学院，吉林省长春市 130116；²吉林农业大学中药材学院，吉林省长春市 130118

第一作者：王东旭，女，1994年生，吉林省长春市人，汉族，2019年吉林农业大学毕业，硕士，助理研究员，主要从事鹿茸科学与生物医学模型的建立。

通讯作者：李春义，教授，长春科技学院，吉林省长春市 130116；吉林农业大学中药材学院，吉林省长春市 130118

共同通讯作者：张国坤，副研究员，长春科技学院，吉林省长春市 130116

https://orcid.org/0000-0003-2177-418X (张国坤)；https://orcid.org/0000-0001-7275-4440 (李春义)

基金资助：国家自然科学基金项目(U20A20403)，项目负责人：李春义

引用本文：王东旭，任晶，李吉萍，王玉俗，胡鹏飞，张国坤，李春义. 鹿茸干细胞来源外泌体调控 NF- κ B 信号通路预防小鼠酒精性肝损伤 [J]. 中国组织工程研究，2023，27(00):000-000.



Abstract

BACKGROUND: Excessive alcohol intake can lead to many liver diseases, but there is currently no effective drug to prevent it. Previous studies have found that antler stem cells can significantly improve liver fibrosis, and it is speculated that the therapeutic effect may be achieved through paracrine effects.

OBJECTIVE: To investigate the preventive effects of antler stem cell-derived exosomes on acute liver injury in mice and its underlying mechanism.

METHODS: Forty C57BL/6 mice were randomly divided into the control, model, bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome prevention, and antler stem cell-derived exosome prevention groups ($n=10$). The prevention groups were intervened with exosomes for 7 consecutive days, and the model group was intervened with PBS, followed by 50% alcohol (15 mL/kg) gavage for modeling of acute alcoholic liver injury. At 24 hours after gavage, liver indexes were calculated; liver injury and redox indexes were detected; the pathological lesions of liver tissues were evaluated and the expression levels of inflammatory factors and nuclear factor- κ B signaling pathway-related genes were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Antler stem cell-derived exosome significantly reduced liver injury, including increasing body weight, decreasing alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase levels in serum, improving liver histopathological lesions, promoting proliferation and division of the hepatocytes and increasing antioxidant levels (increasing glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels and decreasing malondialdehyde levels). The effects were stronger than those of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes. (2) Further studies revealed that antler stem cell-derived exosome significantly reduced the mRNA expression levels of relevant inflammatory factors (interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor α) and protein expression levels of nuclear factor- κ B signaling pathway-related genes (p65, p-p65, I κ B and p-I κ B) in liver tissues. (3) Overall, our results suggest that antler stem cell-derived exosomes can play an important role in protecting the liver by reducing the damage caused by alcohol, and its effects may be achieved via targeting the nuclear factor- κ B signaling pathway.

Key words: antler stem cell; exosome; alcoholic liver injury; inflammation; nuclear factor- κ B signaling pathway

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. U20A20403 (to LCY)

How to cite this article: WANG DX, REN J, LI JP, WANG YS, HU PF, ZHANG GK, LI CY. Deer antler stem cell-derived exosomes prevent alcoholic liver injury via modulating nuclear factor kappa B signaling pathway in mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(00):0000-0000.

0 引言 Introduction

酒精性饮品在人们的日常生活中不可或缺,而肝脏的诸多疾病即是来源于过度的酒精摄入,且以酒精性肝损伤最为显著^[1]。酒精性肝损伤根据其演变阶段可分为单纯性脂肪肝、酒精性肝炎、肝纤维化、酒精性肝硬化,严重者可导致肝细胞坏死、肝衰竭甚至是肝癌^[1-2]。目前,酒精性肝损伤已成为威胁人类健康的一大严重问题。在中国,酒精性肝损伤已成为继病毒性肝炎后导致肝损伤的第二大病因^[3];在欧洲等发达国家,酒精性肝损伤则是肝硬化最主要的病因^[4]。酒精性肝损伤发病率逐年上升,然而目前保护肝脏免受酒精损伤的方法却极为有限,主要是以戒酒为主,尚无有效防治药物。普遍认为大量的酒精摄入会损伤肠道黏膜,致使肠道内产生大量的有毒物质进入肝脏,导致肝脏脂质代谢异常、炎症浸润和氧化应激等生理反应^[5]。研究发现 NF- κ B 信号通路的激活是导致上述异常生理反应的主要因素之一。NF- κ B 是一种核转录因子,几乎存在于所有动物细胞类型中,静息状态下在胞浆中以无活性形式存在;细胞一旦受到刺激,则被激活,从而对炎症等生理活动发挥重要的调控作用^[6-7]。

鹿茸是名贵的传统中药,被誉为“动物药之首”,具有强筋骨、提高免疫力、促进机体新陈代谢和延缓衰老等显著疗效。研究证实,鹿茸这些疗效与其本身的生物学特性高度相关。鹿茸是目前发现的唯一在失去后还能够周期性完全再生的哺乳动物器官;在快速生长期,鹿茸的生长速度可达 2.75 cm/d^[8],研究发现是鹿茸尖部的间充质细胞快速分裂导致了鹿茸超速生长^[9]。作者所在团队前期研究发现,鹿茸间充质细胞兼具胚胎干细胞和成体干细胞双重属性,所以定义其为鹿茸干细胞^[10]。鹿茸干细胞在治疗肝纤维化方面表现出了极强的优势,能够减少胶原纤维的沉积、脂肪变性、炎症发生,以及能促进肝实质细胞再生和增强肝功能等^[11]。干细胞疗法已成为治疗肝损伤重要的手段^[12]。同时,目前大多数认为干细胞主要是通过旁分泌效应发挥治疗作用,而非是细胞本身参与了损伤后修复组织的形成^[13]。

该研究分离了鹿茸干细胞的主要旁分泌成分——外泌体 (AnSC-derived exosomes, AnSC-exos),并通过酒精性肝损伤小鼠模型检测了其预防效果,在此基础上探究其相关作用机制,为开发鹿茸这一特种经济动物资源和临床上实现酒精性肝损伤症状减轻甚至逆转提供科学依据和探索路径。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞培养及体内预防实验,首先对鹿茸干细胞外泌体进行提取和鉴定,再将外泌体通过尾静脉注射的方式注入小鼠体内(连续 7 d),再通过酒精灌胃的方法建立小鼠急性肝损伤模型,对比各组之间肝损伤的程度。两个样本比较用 t 检验,不同组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 8 月至 2022 年 5 月在长春科技学院鹿茸科学与产品技术研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验仪器 H-7650 透射电镜(日本日立);HS-1000 自动组织脱水机(浙江华速);BN-802A 石蜡包埋机(湖北贝诺);RM2255 石蜡切片机(德国 Leica);BN-803A 生物组织摊片烤片机(湖北贝诺);MY-CD5026P 电压力锅(佛山美的);Evos XL Core 倒置显微镜(美国 Invitrogen);M8 数字扫描显微成像系统(德国 Precipoint);DNM-9602 酶标分析仪(北京普朗新);VORTEX-1 漩涡震荡仪(济南欧莱博);3K15 冷冻离心机(美国 Sigma)。

1.3.2 实验试剂 40 g/L 多聚甲醛(合肥 Biosharp, BL539A);DMEM 基础培养基(美国 Gibco, C11995500BT);血清谷丙转氨酶检测盒(南京建成,COO9-1-1);谷草转氨酶检测盒(南京建成,CO10-1-1);谷胱甘肽过氧化物酶检测盒(南京建成, A005);总超氧化物歧化酶检测盒(南京建成, A001);丙二醛试剂盒(南京建成, A003-1);石蜡(德国 Leica, 39601006);苏木精-伊红染色试剂盒(北京 Solarbio, G1120);免疫组化试剂盒(合肥迈新, Kit-9710);反转录试剂盒(日本 Takara, RR047A);RIPA 裂解液(上海 Beyotime,

P0013); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京 Solarbio, PC0020); 30% 丙烯酰胺混合液 (上海 Beyotime, ST003); 10×SDS-PAGE 电泳液 (上海 Beyotime, P0014D); 5×蛋白上样缓冲液 (上海 Beyotime, P0015); 10×TBST (北京 Solarbio, T1081); 10×电转液 (北京 Solarbio, D1060-500); NF-κBp65 抗体 (CST, Rabbit mAb#8242); p-p65 抗体 (CST, Rabbit mAb#3033); IKBα 抗体 (CST, Mouse mAb#4814); p-IKBα 抗体 (CST, Rabbit mAb#2859)。

1.3.3 实验动物 40 只 7 周龄 C57BL6 雌性小鼠, 体质量 (22±2) g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 许可证号: SCXK (辽) 2020-0001。实验方案和程序均在长春科技学院实验动物伦理委员会监督下开展 (批准号: CKARI202104)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞分离及培养

(1) 鹿茸干细胞: 采集二杠期鹿茸间充质组织 (取样方法见文献 [14]), 使用实验室自制小切刀 (ZL 201420335401.8) 将组织切成 0.7 mm 的薄片, 然后在 200 U/mL 的 I 型胶原酶中消化 30 min, 显微镜下可见组织出现毛边。将组织于 DMEM 完全培养基 (含体积分数为 10% 胎牛血清) 中进行原代细胞培养 (37℃、体积分数为 5% CO₂), 待细胞由贴壁组织块周边爬出时, 更换培养液, 待细胞密度长至 70% 时, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化 1 min 后, 离心收集细胞 (1 000 r/min, 5 min), 然后在 DMEM 完全培养基中进行传代培养^[15]。

鹿茸干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	鹿茸间充质组织
原代培养方法:	酶消化法培养
基础培养基:	DMEM 培养基
添加材料:	基础培养基中添加了体积分数为 10% 胎牛血清、1% 青霉素、1% 链霉素
原代培养时间:	原代细胞贴壁后加少量完全培养基, 之后 2 d 换液 1 次, 细胞密度达到 80% 时进行传代
细胞传代:	细胞融合至 70% 时用 1 mL 胰蛋白酶消化, 按 1 : 3 比例传代, 约 3 d 传 1 代, 共传 5 代
细胞鉴定:	采用流式细胞术、免疫荧光染色、成骨 / 成软骨 / 成脂诱导分化进行鉴定
伦理学批准:	该实验经长春科技学院实验动物伦理委员会批准

(2) 小鼠骨髓间充质干细胞: 作者所在实验室冻存, 培养条件同鹿茸干细胞。

1.4.2 外泌体提取与鉴定 将传代次数为 3–5 代的鹿茸干细胞和骨髓间充质干细胞于 DMEM 完全培养基中培养, 待细胞密度长至 90% 时, 更换为 UltraCULTURE 无血清培养基 (含 200 mmol/L 的 L-谷氨酰胺), 72 h 后收集上清液, 采用滤膜过滤的方式去除细胞碎片和凋亡体, 然后按照上海翌圣的外泌体分离试剂盒操作方法获得鹿茸干细胞来源外泌体和骨髓间充质干细胞来源外泌体^[16-17]。所得外泌体进一步进行透射电镜和粒径分析仪 (NanoSight NS300, Malvern Instruments,

UK) 分析确认。

1.4.3 动物分组及模型制备 将 40 只 C57BL6 雌性小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 对照组和模型组分别经尾静脉注射 PBS, 骨髓间充质干细胞来源外泌体预防组 (BMSC-exos) 经尾静脉注射骨髓间充质干细胞来源外泌体 (50 μg/只), 鹿茸干细胞来源外泌体预防组 (AnSC-exos) 经尾静脉注射鹿茸干细胞来源外泌体 (50 μg/只), 连续给药 7 d。末次处理 2 h 后, 给予体积分数为 50% 的酒精 (15 mL/kg) 灌胃 1 次 (对照组除外), 建立急性酒精性肝损伤模型。灌胃后 24 h 眼球取血 (用于分离血清), 处死小鼠摘取肝组织 (分别固定和冻存)。称量肝质量, 计算肝指数, 肝指数 = 肝脏质量 (g)/体质量 (g)×100%。

1.4.4 肝损伤指标检测 将所取全血于室温静置 2 h, 然后 3 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 按照试剂盒所述步骤检测谷草转氨酶和谷丙转氨酶水平。

1.4.5 氧化还原指标检测 按照试剂盒的说明分别检测血清中丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶水平。称取肝脏相同部位的肝组织 0.2 g, 加入 9 倍量生理盐水制成 10% 肝组织匀浆, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按试剂盒说明检测丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶水平。

1.4.6 苏木精-伊红染色 取小鼠肝组织, 于体积分数为 10% 甲醛中固定, 梯度乙醇脱水, 经二甲苯处理使组织透明; 石蜡包埋后切片 (厚 5 μm), 进行苏木精-伊红染色, 于显微镜下观察并拍照。

1.4.7 免疫组化染色 石蜡切片脱蜡后用柠檬酸抗原修复液修复 10 min 恢复至室温; PBS 洗涤后滴加阻断内源性过氧化物酶, 室温放置 10 min; 洗涤后滴加非特异染色阻断剂, 室温放置 10 min; 弃去液体直接滴加 Ki67 抗体, 4℃孵育过夜; 洗涤后滴加生物素标记的 IgG 聚合物, 室温放置 10 min; 洗涤后加入链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶, 室温放置 10 min; 洗涤后滴加 DAB 显色液显色, 苏木精复染, 中性树脂封固, 于显微镜下观察并拍照。

1.4.8 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 将冻存的组织于液氮中研磨后置于 RNase-free 的离心管中, 加入 Trizol (1 mL) 混匀提取总 RNA, 然后 Takala 反转录试剂盒合成 cDNA。利用 qPCR Master Mix (12.5 μL)、Forward primer (0.8 μL)、Reverse primer (0.8 μL)、RNase inhibitor (8.5 μL)、ddH₂O nuclease-free (0.4 μL)、Tap DNA polymase (2 μL)、cDNA (2.5 μL)、Total volume (25 μL) 反应体系进行 qRT-PCR 检测。其中白细胞介素 1β 引物序列为: 5'-ATG GCA GAA GTA CCT AAG CTC-3', 3'-TTA GGA AGA CAC AAA TTG CAT GGT GAA CTC AGT-5'; 白细胞介素 6 引物序列为: 5'-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC-3', 3'-CTA CAT TTG CCG AAG AGC CCT CAG GCT GGA CTG-5'; 肿瘤坏死因子 α 引物序列为: 5'-ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC-3', 3'-TCA CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC CTG CCC-5'; GAPDH 引物序列为: 5'-TGC CCC CAT GTT TGT GAT G-3', 3'-TGT GGT CAT GAG CCC TTC C-5'。

使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算 mRNA 的相对表达量, 实验重复 3 次。

1.4.9 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 取各组小鼠肝组织, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 裂解后 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清即为蛋白。将适量蛋白加入 buffer 煮好后按顺序进行凝胶电泳、浓缩胶 (80 V 30 min)、分离胶 (120 V 60 min)、转膜 (80 V 120 min), 5% 脱脂奶粉 4 ℃ 封闭过夜, 清洗后加入 p65、p-p65、IKB、p-IKB、GAPDH 一抗室温孵育 2 h, 清洗后加入二抗 (羊抗小鼠 IgG-HRP 和羊抗兔 IgG-HRP) 室温下孵育 1 h, ECL 曝光, 曝光条带用 Image J 软件分析。实验重复 3 次。

1.5 主要观察指标 ①小鼠体质量和肝脏指数; ②小鼠血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶、总超氧化物歧化酶水平; ③小鼠肝组织丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶、总超氧化物歧化酶水平; ④苏木精-伊红染色观察小鼠肝组织病理病变; ⑤免疫组化法检测小鼠肝组织 Ki67 表达; ⑥ Western blot 检测小鼠肝组织 p65、p-p65、IKB、p-IKB 蛋白的表达; ⑦ qRT-PCR 检测小鼠肝组织白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的 mRNA 水平。

1.6 统计学分析 实验数据采用 Prism Graphpad 软件进行统计学分析。两个样本比较用 t 检验, 不同组间比较采用单因素方差分析; 结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过长春科技学院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 参加实验小鼠数量为 40 只, 随机分为 4 组, 每组 10 只。40 只小鼠均进入结果分析, 中途无脱落。

2.2 鹿茸干细胞来源外泌体鉴定结果 透射电镜观察显示外泌体呈杯口状结构, 符合外泌体的基本特征, 见图 1A。粒径分析仪测定结果显示外泌体的粒径分布在 30–150 nm 之间, 峰尺寸在 140 nm 左右, 见图 1B。这些结果表明已成功分离出鹿茸干细胞来源外泌体。

2.3 鹿茸干细胞来源外泌体对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏指数及肝功能的影响 酒精灌胃后的小鼠体质量显著减轻 ($P < 0.000 1$), 而肝脏指数并无显著变化 ($P > 0.05$), 见图 2A, B。酒精灌胃诱导了谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平显著升高 ($P < 0.000 1$), 2 个外泌体处理组均显著抑制了谷丙转氨酶水平的升高 ($P < 0.05$, $P < 0.000 1$), 且鹿茸干细胞来源外泌体的抑制效果显著强于骨髓间充质干细胞来源外泌体 ($P < 0.000 1$), 见图 2C; 同时, 鹿茸干细胞来源外泌体还显著抑制了谷草转氨酶水平的升高 ($P < 0.000 1$), 且抑制效果显著强于骨髓间充质干细胞来源外泌体 ($P < 0.000 1$), 见图 2D。这提示, 鹿茸干细胞来源外泌体对急性酒精性肝损伤具有有效的预防性保护作用。

2.4 鹿茸干细胞来源外泌体对急性酒精性肝损伤小鼠血清及肝脏氧化还原指标的影响 分析小鼠血清及肝脏丙二醛水平, 结果显示模型组丙二醛水平显著高于对照组 ($P < 0.000 1$), 2 个外泌体组均显著抑制了丙二醛水平的升高 ($P < 0.001$,

$P < 0.000 1$), 且鹿茸干细胞来源外泌体预防组的抑制效果显著强于骨髓间充质干细胞来源外泌体预防组 ($P < 0.001$), 见图 3, 提示鹿茸干细胞来源外泌体可增强机体对氧自由基的清除, 有效改善酒精性肝损伤小鼠的脂质过氧化。

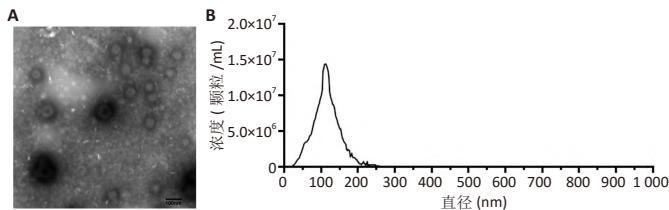
分析小鼠血清及肝脏谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶的水平, 结果显示模型组谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶水平显著降低 ($P < 0.000 1$), 2 个外泌体组均显著促进了谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶水平的升高 ($P < 0.000 1$), 且鹿茸干细胞来源外泌体预防组的促进效果显著强于骨髓间充质干细胞来源外泌体预防组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 3, 提示鹿茸干细胞来源外泌体对肝脏组织的氧化损伤具有有效的保护作用, 能提高肝脏的抗氧化能力, 降低脂质过氧化水平, 有效预防氧化应激的发生。

2.5 鹿茸干细胞来源外泌体对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏病理形态的影响 分析小鼠肝脏病理切片苏木精-伊红染色结果, 对照组小鼠肝小叶结构清楚, 肝细胞索呈放射状排列, 胞浆内无脂质液泡分布, 肝窦和肝细胞均未见异常病理改变; 模型组小鼠肝小叶结构破坏, 排列杂乱无章, 细胞间隙模糊, 大多数肝细胞肿胀, 并且胞浆内有大量的脂质液泡, 出现炎性细胞浸润现象 ($P < 0.000 1$), 表明急性酒精对肝组织造成明显的损伤; 骨髓间充质干细胞来源外泌体预防组和鹿茸干细胞来源外泌体预防组小鼠肝细胞病变程度相对模型组均有所减轻, 但鹿茸干细胞来源外泌体预防组减轻程度更大一些, 肝细胞坏死程度均相对较轻, 肝细胞形态结构未见明显异常, 肝细胞较完整, 整体染色均一, 间隙清晰, 肝细胞肿胀及脂肪变性不明显, 肝细胞内仅有极少的脂质液泡, 少量炎性细胞浸润, 肝损伤明显减轻 ($P < 0.000 1$), 见图 4。这些结果提示鹿茸干细胞来源外泌体预防组可以保护酒精性肝损伤小鼠的肝脏组织结构。

分析小鼠肝组织免疫组化病理切片, 经全视野 M8 显微镜扫描整张切片, 以细胞核颜色为深棕色、棕黄色和浅黄色判定为阳性, 细胞核蓝色为阴性为依据, 用 Image J 计算 Ki67 阳性表达结果, 模型组表达量远低于对照组 ($P < 0.000 1$), 骨髓间充质干细胞来源外泌体预防组与模型组间 Ki67 阳性表达量无统计学差异 ($P > 0.05$), 但鹿茸干细胞来源外泌体预防组 Ki67 阳性表达量较模型组显著升高 ($P < 0.000 1$)。骨髓间充质干细胞来源外泌体预防组与鹿茸干细胞来源外泌体预防组有显著性差异 ($P < 0.000 1$)。这提示鹿茸干细胞来源外泌体在促进组织增殖方面也有显著效果, 可以通过促进肝组织的增殖来修复补充受损的组织, 保护肝脏, 且效果显著优于骨髓间充质干细胞来源外泌体, 见图 4。

2.6 鹿茸干细胞来源外泌体对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏炎症因子表达的影响 分析小鼠肝脏中白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 表达, 结果显示模型组小鼠肝脏中白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 表达远高于对照组 ($P < 0.000 1$), 相比模型组, 鹿茸干细胞来源外泌体预防组炎症因子表达显著减少 ($P < 0.001$), 见图 5。这提示鹿茸干细胞来源

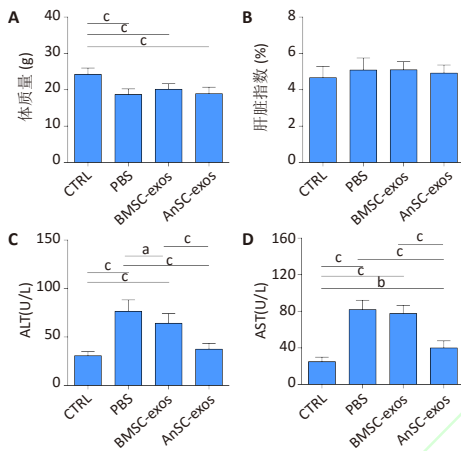
外泌体能有效抑制酒精性肝损伤小鼠肝脏中白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 等炎症因子的表达,这可能与有效减轻酒精性肝损伤小鼠肝脏炎症反应的作用有关。



图注:图 A 为透射电镜观察外泌体的结构呈杯口状;B 为粒径分析仪检测结果

图 1 | 鹿茸干细胞来源外泌体鉴定结果

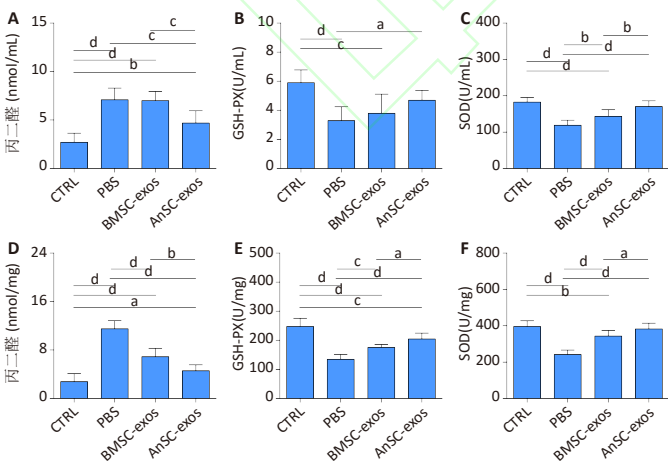
Figure 1 | Identification results of exosomes derived from deer antler stem cells



图注:图 A 为小鼠体重, B 为肝指数; C 为血清谷丙转氨酶 (ALT) 水平; D 为血清谷草转氨酶 (AST) 水平。CTRL: 对照组; PBS: 模型组; BMSC-exos: 骨髓间充质干细胞来源外泌体预防组; AnSC-exos: 鹿茸干细胞来源外泌体预防组。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=10$, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, $^cP < 0.0001$

图 2 | 各组小鼠体重、肝脏指数及血清肝损伤指标

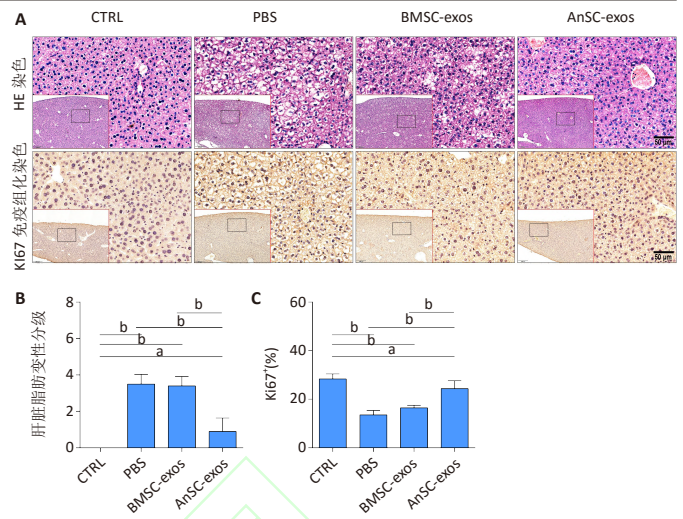
Figure 2 | Body mass, liver index and serum liver injury index of mice in each group



图注:图 A-C 为血清丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX)、超氧化物歧化酶 (SOD) 水平; D-F 为肝脏丙二醛、GSH-PX、SOD 水平。CTRL: 对照组; PBS: 模型组; BMSC-exos: 骨髓间充质干细胞来源外泌体组; AnSC-exos: 鹿茸干细胞来源外泌体预防组。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=10$, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, $^cP < 0.001$, $^dP < 0.0001$

图 3 | 鹿茸干细胞来源外泌体对小鼠氧化还原指标的影响

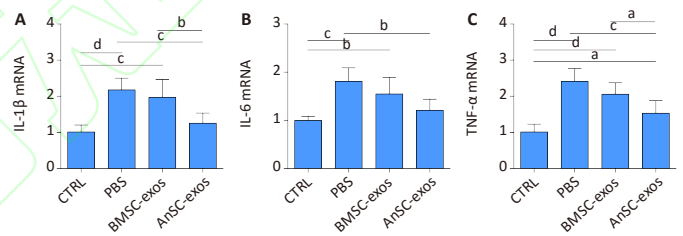
Figure 3 | Influence of exosomes derived from deer antler stem cells on redox indexes of mice in each group



图注:图 A 为肝脏苏木精-伊红 (HE) 染色及 Ki67 免疫组化染色 (小图放大 20 倍, 大图放大 40 倍); B 为肝脏脂肪变性分级统计; C 为 Ki67 免疫组化阳性率统计。CTRL: 对照组; PBS: 模型组; BMSC-exos: 骨髓间充质干细胞来源外泌体预防组; AnSC-exos: 鹿茸干细胞来源外泌体预防组。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=10$, $^aP < 0.01$, $^bP < 0.0001$

图 4 | 鹿茸干细胞来源外泌体对小鼠肝脏病理形态的影响

Figure 4 | Effect of antler stem cell-derived exosomes on the pathological morphology of mouse liver of each group



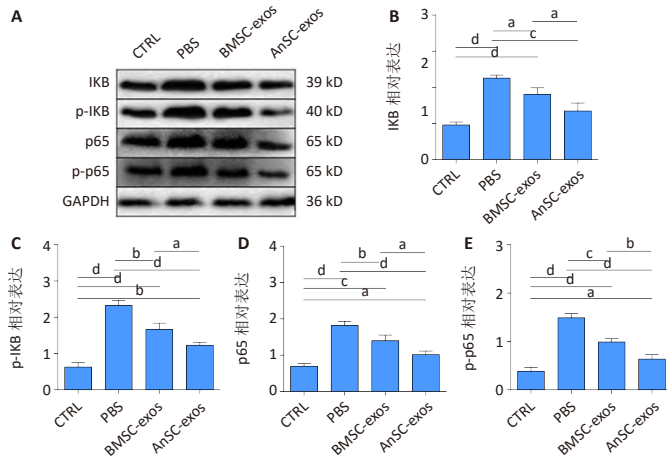
图注:图 A 为白细胞介素 1(IL-1 β) 的 mRNA 表达; B 为白细胞介素 6(IL-6) 的 mRNA 表达; C 为肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的 mRNA 表达。CTRL: 对照组; PBS: 模型组; BMSC-exos: 骨髓间充质干细胞来源外泌体预防组; AnSC-exos: 鹿茸干细胞来源外泌体预防组。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=10$, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, $^cP < 0.001$, $^dP < 0.0001$

图 5 | 鹿茸干细胞来源外泌体对小鼠肝脏炎症因子表达的影响

Figure 5 | Effects of antler stem cell-derived exosomes on the level of inflammatory factors in mice of each group

2.7 鹿茸干细胞来源外泌体对急性酒精性肝损伤小鼠 p65、p-p65、IKB、p-IKB 蛋白表达的影响 对 p65、p-p65、IKB、p-IKB 蛋白表达水平进行验证,结果显示,模型组 4 种蛋白的相对表达均远高于对照组 ($P < 0.0001$),相比模型组,骨髓间充质干细胞来源外泌体预防组和鹿茸干细胞来源外泌体预防组 4 种蛋白均有所降低,但鹿茸干细胞来源外泌体预防组降低的更为显著 ($P < 0.0001$ 或 $P < 0.001$),提示鹿茸干细胞来源外泌体可以通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活,有效地减轻炎症反应,进而起到保护肝脏的作用,见图 6。

2.8 生物相容性 外泌体经小鼠尾静脉注射 (1 次/d, 持续 7 d); 注射后,小鼠精神活跃,未见异常。酒精灌胃后小鼠出现醉酒状态,在灌胃后三四个小时逐渐苏醒恢复正常饮食及生理状态。实验过程中动物未出现死亡。



图注：图A为p65、p-p65、IKB、p-IBK的Western blot蛋白条带；B为IKB蛋白条带的相对灰度；C为p-IBK蛋白条带的相对灰度；D为p65蛋白条带的相对灰度；E为p-p65蛋白条带的相对灰度。CTRL：对照组；PBS：模型组；BMSC-exos：骨髓间充质干细胞来源外泌体预防组；AnSC-exos：鹿茸干细胞来源外泌体预防组。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示， $n=10$ ， $^aP < 0.05$ ， $^bP < 0.01$ ， $^cP < 0.001$ ， $^dP < 0.0001$

图6 | 鹿茸干细胞来源外泌体对急性酒精性肝损伤小鼠肝组织p65、p-p65、IKB、p-IBK蛋白表达的影响

Figure 6 | Effects of antler stem cell-derived exosomes on the expression of p65, p-p65, IKB and p-IBK proteins in liver tissue of acute alcoholic liver injury mice

3 讨论 Discussion

酒精作为精神食粮在日常生活中必不可少，酒精进入人体后通过胃肠道吸收进入血液循环，吸收后的酒精超过95%要通过肝脏代谢，长期过量饮酒是造成肝脏疾病发生的主要原因，酒精性肝病已成为中国最主要的慢性肝脏疾病之一^[18]。酒精及其代谢物可以直接或间接诱导炎症反应、氧化应激以及蛋白质营养失衡等多种病理生理过程，这些因素相互作用，最终导致酒精性肝病的发生^[19-20]。

谷丙转氨酶和谷草转氨酶大量分布于机体组织细胞内，当肝脏受到酒精损害时，肝细胞被破坏，谷丙转氨酶和谷草转氨酶就会分散到血液中^[21-22]。因此，血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性常作为判断肝损伤的指标^[23]。该研究显示小鼠建模后可见血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶水平显著升高，而预先给予鹿茸干细胞来源外泌体小鼠的血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶水平明显降低，这一结果可以判断鹿茸干细胞来源外泌体对急性酒精性肝损伤具有一定的预防性保护作用。

肝脏组织病理学观察是评价肝脏损伤程度的金标准，在各类动物肝损伤模型中广泛应用^[24]。酒精性肝损伤受试小鼠肝脏的病理变化以肝细胞脂肪变性为主^[25-26]。将受试小鼠相同部位的肝脏进行苏木精-伊红染色发现建模后小鼠的肝脏出现了大面积的坏死现象，肝小叶结构紊乱，排列杂乱无章，可见大面积脂肪空泡和灶性坏死，细胞间隙模糊；而事先给予鹿茸干细胞来源外泌体小鼠的病变程度较轻，肝细胞形态结构未见明显异常，肝细胞较完整，整体染色均一，肝细胞肿胀及脂肪变性不明显，结合免疫组化Ki67表达结果显示给予鹿茸干细胞来源外泌体小鼠的Ki67表达率要远大于模型组

和骨髓间充质干细胞外泌体预防组，仅次于对照组，这表明鹿茸干细胞来源外泌体不仅可以保护酒精性肝损伤小鼠肝脏组织结构，在促进肝组织增殖方面也有显著效果，可能是通过促进肝组织的增殖来修复和补偿受损的组织，进而保护肝脏。

丙二醛与机体脂类物质氧化应激代谢水平和自由基相关，超氧化物歧化酶主要清除体内多余氧化应激产物，丙二醛、超氧化物歧化酶可间接体现体内自由基及氧化应激产物含量^[27]。丙二醛的测定常常与超氧化物歧化酶的测定相互配合，超氧化物歧化酶活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力，而丙二醛的高低又间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度^[28]。谷胱甘肽过氧化物酶是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶，它特异的催化还原谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应，可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用^[29]。该实验检测结果显示建模后丙二醛水平大幅度上升，尾静脉注射鹿茸干细胞来源外泌体预防组丙二醛水平明显下降，这提示鹿茸干细胞来源外泌体可增强机体对氧自由基的清除，对抗脂质过氧化有很好的效果。超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的数值可以看出鹿茸干细胞来源外泌体对肝脏组织的氧化损伤具有有效的保护作用，不仅能提高肝脏的抗氧化能力，降低脂质过氧化水平，还能有效预防氧化应激的发生。

除氧化应激外，炎症反应也是引起肝损伤的重要原因。酒精摄入会损伤肠道黏膜，导致肠道内大量有毒物质进入肝脏后激活NF- κ B信号通路，诱导细胞活化并释放炎症因子，引起肝脏炎症^[30]。白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 等炎症因子是导致肝脏炎症的重要因素，酒精会刺激库普弗(Kupffer)细胞产生白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α ，造成肝细胞炎症损伤，加剧酒精性肝损伤的进展^[31-32]。白细胞介素1 β 是白细胞介素1家族中的重要成员，由于其在炎症相关疾病中的重要作用而备受关注。白细胞介素1 β 的局部激活是介导促炎反应的中心环节，导致继发性炎症递质(包括白细胞介素6)的激活^[33]。反过来，白细胞介素6系统性地作用于肝脏产生损伤^[34]。与白细胞介素1 β 相似，肿瘤坏死因子 α 是一种多效性促炎细胞因子，属于肿瘤坏死因子配体超家族。肿瘤坏死因子 α 是机体内主要的炎症因子，它的过量产生能够刺激肝脏发生炎症反应，进而导致酒精性肝损伤^[31-32]。qRT-PCR通过检测白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的表达量分析炎症反应的强弱。Western blot研究p65和IKB蛋白的表达量以及p65的磷酸化和IKB的磷酸化可以反映NF- κ B的激活，该研究结果可见模型组p65、IKB、p-p65、p-IBK、白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 表达明显升高，而鹿茸干细胞来源外泌体预防组上述指标均显著降低，可见鹿茸干细胞来源外泌体可抑制NF- κ B信号通路的激活进而抑制肝炎症的发生。

综上，鹿茸干细胞来源外泌体可显著预防小鼠急性酒

精性肝损伤, 而此功能的发挥可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路来阻止炎症的发生, 以及提高机体抗氧化水平所实现的。该研究为临床上酒精性肝损伤的预防治疗提供了又一可行策略, 同时也为鹿茸的开发利用开辟了新的途径。

致谢: 感谢长春科技学院鹿茸科学与产品技术研究所老师的大力支持。

作者贡献: 王东旭负责实验实施、论文撰写, 任晶、李吉萍负责细胞培养、指标检测, 王玉俗、胡鹏飞负责实验数据分析处理, 张国坤、李春义负责数据和文章的校对, 张国坤、李春义负责实验设计。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该研究遵守《观察性临床研究报告指南》(STROBE 指南)。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 赵云霞. 鸡枞菌多糖对小鼠急性酒精肝损伤保护作用的研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2014.
- [2] 刘庆普, 陈燕, 谢彩侠, 等. 桑叶生物碱对小鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 现代食品科技, 2022, 38(6): 1-8.
- [3] 刘岩, 苏琳. 酒精性肝病基层诊疗指南 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(1): 36-40.
- [4] 厉铭. 二烯丙基一硫拮抗小鼠急性肝脏损伤的作用效果及机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [5] 韵海霞, 黄以哲, 穆志龙, 等. 藏药帕珠丸对慢性酒精性肝损伤大鼠肝组织 IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β 1 含量及 TGF- β 1 mRNA 表达的影响 [J]. 青海医学院学报, 2014, 35(2): 119-122.
- [6] LUEDDE T, SCHWABE RF. NF- κ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(2): 108-118.
- [7] HE G, KARIN M. NF- κ B and STAT3- key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res*. 2011;21(1):159-168.
- [8] LANDETE-CASTILLEJOS T, KIERDORF H, GOMEZ S, et al. Antlers- Evolution, development, structure, composition, and biomechanics of an outstanding type of bone. *Bone*. 2019;128:115046.
- [9] 李勋胜, 赵海平, 李春义, 等. 鹿茸神经再生的研究进展 [J]. 生命科学, 2021, 33(8): 955-961.
- [10] LI C, YANG F, SHEPPARD A. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration-insights from studying annual renewal of deer antlers. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2009;4(3):237-251.
- [11] RONG X, YANG Y, ZHANG G, et al. Antler stem cells as a novel stem cell source for reducing liver fibrosis. *Cell Tissue Res*. 2020;379(1):195-206.
- [12] CAO Y, JI C, LU L. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis/ cirrhosis. *Ann Transl Med*. 2020;8(8):562.
- [13] LOU G, CHEN Z, ZHENG M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Exp Mol Med*. 2017;49(6):e346.
- [14] LI C, SUTTIE JM. Tissue collection methods for antler research. *Eur J Morphol*. 2003;41(1):23-30.
- [15] WANG D, BERG D, BA H, et al. Deer antler stem cells are a novel type of cells that sustain full regeneration of a mammalian organ-deer antler. *Cell Death Dis*. 2019;10(6):443.
- [16] ZHANG Y, PAN Y, LIU Y, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulate regenerative wound healing via transforming growth factor- β receptor inhibition. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):434.
- [17] DUAN M, ZHANG Y, ZHANG H, et al. Epidermal stem cell-derived exosomes promote skin regeneration by downregulating transforming growth factor- β 1 in wound healing. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):452.
- [18] 胡戈, 曹建民, 周海涛, 等. 黑果枸杞汁对大鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 中国应用生理学杂志, 2022, 38(3): 241-246.
- [19] 桑文华, 曾美纯, 陈莎, 等. 自噬抑制剂氯喹对急性酒精诱导小鼠肝损伤的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(2): 102-105.
- [20] OHASHI K, PIMIENTA M, SEKI E. Alcoholic liver disease: A current molecular and clinical perspective. *Liver Res*. 2018;2(4):161-172.
- [21] WANG M, MA LJ, YANG Y, et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids for the management of alcoholic liver disease: A critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(sup1):S116-S129.
- [22] CHO SS, LEE JH, KIM KM, et al. REDD1 attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis via inhibiting of TGF- β /Smad signaling pathway. *Free Radic Biol Med*. 2021;176:246-256.
- [23] 黄颖, 谭书明, 陈萍, 等. 蜂蜜多酚提取物对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 食品科学, 2020, 41(21): 154-159.
- [24] UCHIDA T, KAO H, QUISPE-SJOGREN M, et al. Alcoholic foamy degeneration--a pattern of acute alcoholic injury of the liver. *Gastroenterology*. 1983;84(4):683-692.
- [25] HALL PD. The pathological spectrum of alcoholic liver disease. *Pathology*. 1985;17(2):209-218.
- [26] XU QW, SCOTT RB, TAN DT, et al. Slow intestinal transit: a motor disorder contributing to cholesterol gallstone formation in the ground squirrel. *Hepatology*. 1996;23(6):1664-1672.
- [27] 王宏志, 刘俊, 侯晓华. 乌司他丁与川芎嗪合用对急性胰腺炎大鼠氧自由基影响的研究 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2007, 16(3): 271-273.
- [28] 王英丽. 银杏叶提取物抗辐射作用的实验研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2006.
- [29] 刘姝. 急性酒精性肝损伤中槲皮素抗氧化应激及抗炎作用交互影响的机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2019.
- [30] GAO B, AHMAD MF, NAGY LE, et al. Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2019;70(2):249-259.
- [31] BRENNER C, GALLUZZI L, KEPP O, et al. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol*. 2013;59(3):583-594.
- [32] TIAN Y, JOCHUM W, GEORGIEV P, et al. Kupffer cell-dependent TNF- α signaling mediates injury in the arterialized small-for-size liver transplantation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(12):4598-4603.
- [33] HE Y, HWANG S, AHMED YA, et al. Immunopathobiology and therapeutic targets related to cytokines in liver diseases. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(1):18-37.
- [34] SCHMIDT-ARRAS D, ROSE-JOHN S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol*. 2016;64(6):1403-1415.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)