

调控 Tim-3 通路在免疫性肝损伤大鼠中对 Th17 细胞的影响

张文, 张蓓*, 李秀梅, 沈若武, 丛蓓蓓, 杨丽华, 孙东君, 王建伟

(青岛大学医学院免疫教研室, 山东 青岛 266071)

【摘要】 目的 建立免疫性肝损伤模型,探讨 Tim-3 通路在阻断或激活时对 Th17 细胞的影响。方法 大鼠尾静脉注射刀豆蛋白 A (ConA) 8 周,建立免疫性肝损伤模型。无菌取脾脏制备脾淋巴细胞,取外周血分离血清后于 -20°C 保存,取肝脏组织放入 4% 的多聚甲醛中固定备用。在 96 孔板上将脾淋巴细胞平均分成 5 组,即阻断实验组、阻断对照组、激活实验组、激活对照组和 ConA 对照组。用 Tim-3 的单克隆抗体即 Anti-Tim-3 来阻断 Tim-3 通路;用 Tim-3 的重组配体 galectin-9 来激活 Tim-3 通路, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 72 h,收集细胞上清液于 -20°C 保存。生化分析法测血清中 ALT、AST 和 ALB 的表达;HE 染色观察肝脏组织的病理变化;免疫组化法测肝脏组织中 IL-17A 和 ROR- γt 蛋白的表达;ELISA 法测细胞上清液中 IL-17A 及 IL-6 的表达;实时定量 PCR 测各组脾淋巴细胞 ROR- γt mRNA 的表达。结果 与对照组相比,模型组 HE 染色可见明显的炎性细胞浸润、肝脏组织损伤及较多的假小叶,免疫组化可见 IL-17A 和 ROR- γt 蛋白的表达明显升高;与阻断对照组相比,阻断实验组中 IL-17A 和 IL-6 的水平升高 ($P < 0.05$);与激活对照组相比,激活实验组中 IL-17A 和 IL-6 的水平降低 ($P < 0.05$);实时定量 PCR 显示与阻断对照组相比,阻断实验组中 ROR- γt mRNA 的表达明显增加 ($P < 0.05$)。结论 免疫性肝损伤的发病与 Th17 细胞密切相关,免疫调控 Tim-3 通路可通过影响 Th17 细胞效应,进而参与免疫性肝损伤的发病机制。

【关键词】 免疫性肝损伤;Tim-3 通路;Th17 细胞;大鼠

【中图分类号】 Q95-33, R392.12 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0007-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.002

Effect of regulation of Tim-3 pathway on Th17 cells in rats with immunological hepatic injury

ZHANG Wen, ZHANG Bei, LI Xiu-mei, SHEN Ruo-wu, CONG Bei-bei,
YANG Li-hua, SUN Dong-jun, WANG Jian-wei

(Department of Immunology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China)

【Abstract】 Objective To establish a rat model of immunological hepatic injury and to explore the effect of blocking or activating Tim-3 pathway on Th17 cells in the rats. **Methods** Forty SPF male Wistar rats (body weight 180 ± 20 g) were used in this study. The rat model of immunological hepatic injury was established by injecting 12.5 mg/kg concanavalin A (Con A) through the tail vein once a week for eight weeks. Splenic lymphocytes were isolated. Serum was separated and stored in -20°C . Liver tissue samples were fixed in 4% paraformaldehyde for further study. The splenic lymphocytes were divided into 5 groups: blocking group, blocking control group, activating group, activating control group and ConA control group. The Tim-3 pathway was blocked by anti-Tim-3 while activated by recombinant galectin-9, and cultured 72 h under 37°C , 5% CO_2 environment. The cell culture supernatants were saved at -20°C for later use. Biochemical analysis was performed to determine the expression of serum ALT, AST and ALB. Morphological changes of the liver were examined by histopathology using HE staining. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of IL-17A

【基金项目】国家自然科学基金资助项目(编号:81072398);山东省科技发展计划(编号:2009GG10002044);山东省自然科学基金资助(编号:ZR2014CM037)。

【作者简介】张文(1987-),女,硕士研究生,研究方向:肝脏疾病。E-mail: 1210hb@sina.com。

【通讯作者】张蓓(1973-),女,博士,研究生导师,研究方向:临床免疫。E-mail: zhangbei124@aliyun.com。

and ROR- γ t proteins in the liver tissues. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to assess the IL-17A and IL-6 in the cell supernatants while real time PCR was applied to determine the expression of ROR- γ t mRNA in splenic lymphocytes. **Results** Compared with the control group, inflammatory cell infiltration, hepatic tissue injury and many pseud-olobules were easily found in the liver tissue, and immunohistochemical examination showed significantly increased levels of IL-17A and ROR- γ t proteins in the liver tissues of the model group. The expressions of IL-17A and IL-6 in the blocking group were increased than that of the blocking control group ($P < 0.05$), while the levels of IL-17A and IL-6 in the activating group were lower when compared with that of the activating control group ($P < 0.05$). Compared with the blocking control group, the real time PCR showed that the expression of ROR- γ t mRNA in the blocking group was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** The pathogenesis of immunological hepatic injury is closely related to Th17 cells. Immune-regulating Tim-3 pathways may affect the effect of Th17 cells then further participate in the mechanism of immunological hepatic injury.

【Key words】 Immunological hepatic injury; Tim-3 pathway; Th17 cells; Rat

免疫性肝损伤 (immunological hepatic injury) 是一种由细胞免疫介导的炎症,肝细胞的损伤主要表现为炎性细胞浸润以及肝细胞索的结构破坏。长久以来,人们一直为更有效的治疗肝损伤寻求新的突破^[1,2],而新的突破基于对其机制的进一步明确。前期研究发现 Th17 细胞在免疫性肝损伤中担负着重要的作用^[3,4]。而近来发现,T 细胞免疫球蛋白粘蛋白分子-3 (T cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecules-3, Tim-3) 作为一种新发现的分子,可表达于 Th17 细胞表面,具有负性免疫调控的功能,故对其通路的研究越来越受到人们的重视。半乳糖凝集素-9 (galectin-9) 是各种疾病中研究激活 Tim-3 通路的最常用配体^[5]。目前研究显示 Tim-3 通路在某些免疫性疾病中对 Th17 细胞有影响。Zhang 等^[6]认为给予抗 Tim-3 单克隆抗体即阻断 Tim-3 通路,可加快小鼠自身免疫性脑脊髓膜炎的发病并使 Th17 细胞数量增加、病情加重。Li 等^[7]认为 Tim-3 通路的改变存在于类风湿性关节炎中,并以此作为新的着眼点在深入探究中以期成为治疗的新突破点。Shi 等^[8]认为在溃疡性结肠炎中也存在 Tim-3 通路调控紊乱现象。但有关其在免疫性肝损伤中的研究尚未见报道。本实验探讨性的把 Tim-3 通路作为免疫性肝损伤治疗的新靶标,通过阻断或激活 Tim-3 通路来观察其对 Th17 细胞的影响,进而明确免疫性肝损伤的发病机制,以期为免疫性肝损伤的治疗提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠 40 只,体重为 (180 \pm 20) g, 8 周龄,购于山东省青岛市实验动物和动物实

验中心 [SCXK (鲁) 2009-0007]。饲养于饲养箱,每箱 5 只大鼠,通风良好,环境安静,温度为 (24 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度为 45% ~ 55%,自由饮食与进水。大鼠的组织取材于青岛大学动物实验设施内进行 [SYXK (鲁) 2009-0012]。

1.1.2 试剂与设备

苏木素、伊红及免疫组化的相关多克隆抗体:北京博奥森生物技术公司。重组的半乳糖凝集素-9:美国的 Cloud-Clone Corp 公司。anti-Tim-3: Santa Cruz 公司。Con A 和 ELISA 试剂盒:索莱宝公司。淋巴细胞分离液和红细胞裂解液:美国的 Sigma 公司。

1.2 免疫性肝损伤模型的建立

40 只 Wistar 雄性大鼠随机分为两组,即模型组 (25 只) 和对照组 (15 只)。模型组尾静脉注射 12.5 mg/kg concanavalin A (Con A),每周 1 次连续 8 周;对照组注射 PBS。8 周后即可建模成功。

1.3 脾淋巴细胞的分离及培养

将无菌脾研磨过滤制备成悬液,离心弃上清后用 RPMI 1640 混匀,缓慢加到等体积的淋巴细胞分离液上,离心取白膜。用 RPMI 1640 洗 2 遍后进一步用红细胞裂解液裂解,离心、洗 2 遍,弃上清后加到 1 mL 1640 中混匀,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h 后吸细胞悬液,弃掉贴壁的单核细胞。用含 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素抗生素的 RPMI 1640 调整细胞浓度到 5 \times 10⁶ cells/mL,加 ConA 至终浓度为 5 μ g/mL,以 200 μ L/孔接种于 96 孔板中培养。

1.4 分组并分别加阻断剂或激活剂

将 96 孔板中的脾淋巴细胞平均分为 5 组,即阻断实验组、阻断对照组、激活实验组、激活对照组和 ConA 对照组。阻断实验组加 Tim-3 的单克隆抗体即 anti-Tim-3 至终浓度为 10 μ g/mL,阻断对照组加

等体积的 IgG2a; 激活实验组加配体 galectin-9 至终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 激活对照组加等体积的 PBS, 72 h 后离心取上清液。实验每组中至少有 3 个副孔。

1.5 观察与研究指标

1.5.1 大鼠血清生化指标

用 Olympus 400 的自动生化仪检测大鼠血清中丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 及白蛋白 (ALB) 的水平。

1.5.2 大鼠肝脏组织 HE 染色

4% 多聚甲醛中固定 24 h, 然后经过乙醇梯度脱水、透明、进一步石蜡包埋等过程制成石蜡切块, 4 μm 切片后 HE 染色, 光镜下观察肝脏组织的病理变化。

1.5.3 免疫组化法测 IL-17A 和 ROR- γT 蛋白的表达

制备蜡块, 4 μm 切片后进行脱蜡、水化、PBS 冲洗及抗原修复等步骤。用正常的山羊血清和 3% 的双氧水各封闭 20 min 后加一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日用 PBS 冲洗, 加入生物素标记的羊抗兔 IgG 抗体室温条件下孵育, 20 min 以后用 PBS 洗 3 遍。用 DAB 液显色后镜下观察实验结果, 适时终止反应。用苏木素复染 5 min 后, 进一步进行脱水、透明及封片等步骤, 同时用 PBS 代替一抗做相应的阴性对照。显微镜下观察 IL-17A 和 ROR- γT 蛋白的表达。

1.5.4 ELISA 法检测上清液中 IL-17A 及 IL-6 的表达

依据 ELISA 试剂盒说明书逐步操作。加标准品制作标准曲线, 加待检样品测量, 每个待测样品重复 3 遍。加终止液后, 15 min 内在酶标仪 450 nm 处读取数据。

1.5.5 实时定量 PCR 测脾淋巴细胞 ROR- γT mRNA 的表达

用 Trizol 法提取各组细胞总 RNA。由 Roche 公司生产的逆转录试剂盒进行 cDNA 合成, 按照 Roche 公司 Faststart Essential DNA Green Master (no. 6402712001) 荧光定量试剂盒说明进行 real-time PCR 反应。管家基因 β -actin 是用来规范的总 RNA 量。ROR- γT 引物序列: 上游引物 5' -GTCGTC-

CTCGTCAGAATGT-3', 下游引物 5' -AGAACCAAG-GCCGTGTAG-3', 扩增片段为 197 bp; β -actin 内参序列: 上游引物 5' -CACCCGCGAGTACAACCTTC-3', 下游引物 5' -CCCATACCCACCATCACACC-3', 扩增片段为 206 bp。每份 RNA 样品进行 3 次重复检测, 用 Quantity One 4.62 图像分析软件行光密度测定, 目的片段与 β -actin 光密度之比值作为目的片段 mRNA 相对表达量。

1.6 统计学分析

用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行处理。结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析或 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的一般状态

整个实验过程中, 对照组和模型组的大鼠无死亡。与对照组相比, 随着尾静脉注射次数的增加, 模型组大鼠出现饮水量减少、体重减轻、活跃度明显下降等现象。

2.2 大鼠血清生化指标

与对照组相比, 模型组大鼠血清中 ALT 和 AST 的水平显著升高 ($P < 0.01$), ALB 水平降低 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义 (见表 1)。

2.3 大鼠肝脏组织 HE 染色

肝脏 HE 染色可见: 对照组肝小叶结构较完整, 肝索排列整齐, 肝细胞没有明显的变性坏死和淋巴细胞浸润; 模型组中假小叶较常见, 汇管区可见纤维结缔组织的大量增生, 肝小叶结构破坏, 肝索排列紊乱, 肝细胞坏死较明显并伴有大量淋巴细胞的浸润 (图 1)。

2.4 大鼠肝脏组织中 IL-17A 和 ROR- γT 蛋白的表达

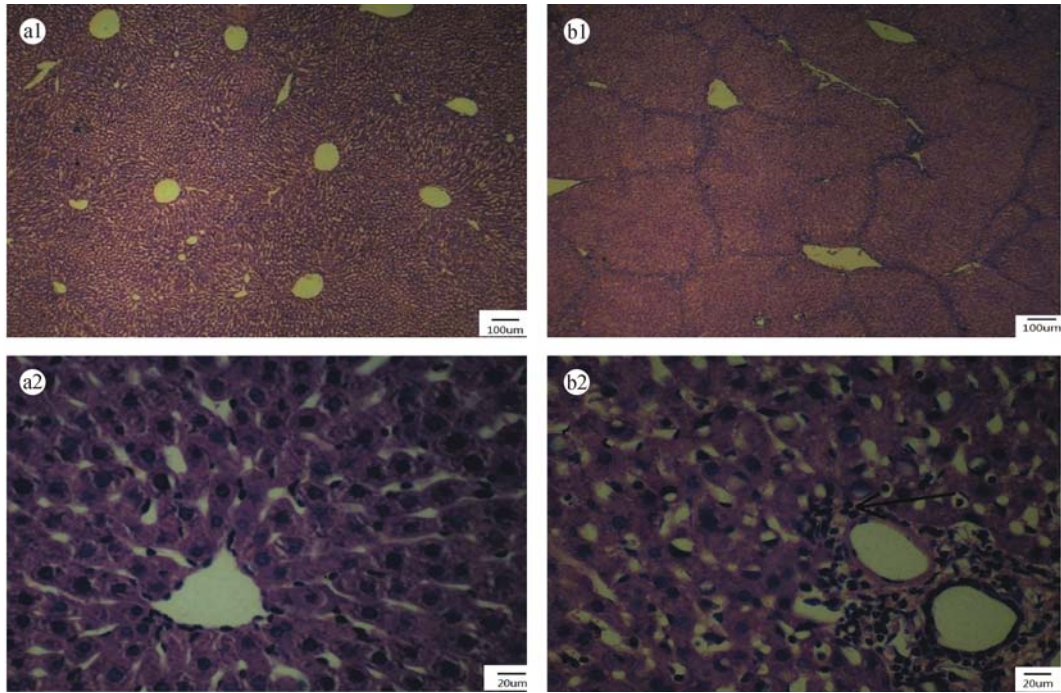
可见大多数 IL-17A 和 ROR- γT 蛋白的分布为弥散性均匀分布, 少数为局灶性分布。且主要集中在各处汇管区及门静脉等部位。与对照组相比, 模型组 IL-17A 和 ROR- γT 蛋白的表达量明显升高 (图 2)。

表 1 大鼠血清生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of serum biochemical indexes of rats

组别 Groups	ConA mg/kg	ALT U/L	AST U/L	ALB g/L
对照组 Control ($n = 15$)	-	52.81 \pm 10.32	175.49 \pm 11.38	33.63 \pm 5.51
模型组 Model ($n = 25$)	12.5	71.35 \pm 13.57**	254.18 \pm 12.45**	26.39 \pm 3.14*

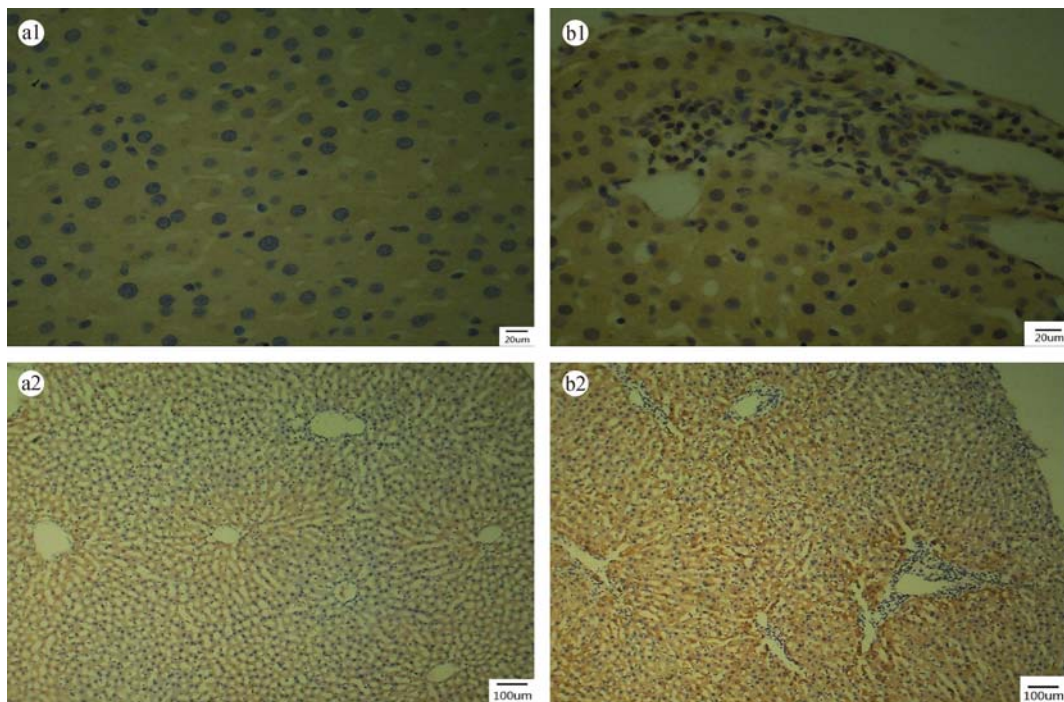
注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control group.



注: a: 对照组; b: 模型组 (a₁、b₁: ×40, a₂、b₂: ×400)。

图 1 大鼠肝脏组织病理变化

Fig. 1 Pathological changes of liver tissue in the rats of control group(a) and model group(b)



注: a: 对照组; b: 模型组。1: IL-17A; 2: ROR- γ t (a₁、b₁: ×400, a₂、b₂: ×100)。

图 2 大鼠肝脏组织中 IL-17A 和 ROR- γ t 蛋白的表达

Fig. 2 Expression of IL-17A and ROR- γ t proteins in the liver tissue of the rats. A control rat (a) and model rat (b). 1: IL-17A; 2: ROR- γ t.

2.5 ELISA 法检测上清液中 IL-17A 及 IL-6 的表达

培养的细胞中加入 Tim-3 单克隆抗体即 anti-Tim-3 时, Tim-3 通路会被阻断, 与阻断对照组相比, 阻断实验组中 IL-17A 和 IL-6 水平升高 ($P < 0.05$); 培养细胞中加入 Tim-3 的配体即重组的 Galectin-9 时, Tim-3 通路会被激活, 与激活对照组相比, 激活实验组中 IL-17A 和 IL-6 水平降低 ($P < 0.05$), 差异

表 2 上清液中 IL-17A 及 IL-6 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Expression of IL-17A and IL-6 in the supernatants

组别 Groups	IL-17A pg/mL	IL-6 ng/L
ConA 对照组 ConA control group	390.56 ± 22.35	561.98 ± 19.37
阻断对照组 Blocking control group	384.93 ± 18.13	563.26 ± 23.68
阻断实验组 Blocking group	475.95 ± 27.98*#	662.34 ± 21.29**
激活对照组 Activating control group	388.32 ± 23.89 [▲]	559.35 ± 25.51 [▲]
激活实验组 Activating group	338.94 ± 16.83** [▲] *	479.18 ± 16.96** [▲] *

注: 与 ConA 对照组比较, * $P < 0.05$; 与阻断对照组比较, # $P < 0.05$; 与阻断实验组比较, [▲] $P < 0.05$; 与激活对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, vs. ConA control group; # $P < 0.05$, vs. blocking control group; [▲] $P < 0.05$ vs. blocking group; * $P < 0.05$, vs. activating control group.

表 3 脾淋巴细胞中 ROR- γ t mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Expression of ROR- γ t mRNA in the splenic lymphocytes

组别 Groups	处理 Treatment	表达量 Expression (ROR- γ t/ β -actin)
ConA 对照组 ConA control group	-	1.59 ± 0.12
阻断对照组 Blocking control group	IgG2a	1.58 ± 0.11
阻断实验组 Blocking group	Anti-Tim-3	2.46 ± 0.15**
激活对照组 Activating control group	PBS	1.57 ± 0.08 [▲]
激活实验组 Activating group	Galectin-9	0.79 ± 0.07** [▲] *

注: 与 ConA 对照组比较, * $P < 0.05$; 与阻断对照组比较, # $P < 0.05$; 与阻断实验组比较, [▲] $P < 0.05$; 与激活对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, vs. ConA control group; # $P < 0.05$, vs. blocking control group; [▲] $P < 0.05$ vs. blocking group; * $P < 0.05$, vs. activating control group.

3 讨论

肝损伤已成为全球性疾病, 发病率高, 临床难愈, 关键在于机制不清。目前研究发现 ConA 诱导的肝损伤模型是探究免疫性肝损害较为成功经典的模型^[9,10]。ConA 本质为一种 T 细胞丝裂原, 可激活 T 淋巴细胞分泌大量的细胞因子, 引发特异性肝损伤。本实验采用尾静脉注射 ConA 法建模, 血清生化结果显示, 与对照组相比, 模型组的 ALT、AST 水平均显著升高 ($P < 0.01$), ALB 水平降低 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义; HE 染色表明, 模型组大鼠的肝小叶结构破坏, 肝细胞坏死明显并伴有大量淋巴细胞的浸润, 假小叶形成较多见, 差异与对照组相比有明显变化, 以上结果可充分表明免疫性肝损伤模型建造成功。

Th17 细胞是一群新近鉴定的在自身免疫病及炎症反应中发挥重要作用的 Th 细胞亚群。研究发

有显著性(见表 2)。

2.6 脾淋巴细胞 ROR- γ t mRNA 的表达结果

与阻断对照组相比, 阻断实验组中 ROR- γ t mRNA 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与激活对照组相比, 激活实验组中 ROR- γ t mRNA 的表达水平降低 ($P < 0.05$), 差异有显著性; ConA 对照组、阻断对照组和激活对照组间相比变化不大(见表 3)。

现 Th17 细胞主要分泌细胞因子 IL-17A, 起着募集中性粒细胞、促进炎症反应的作用^[11-13]。细胞因子 IL-6 是生成 Th17 细胞的重要始动因子, ROR- γ t 是 Th17 细胞的重要转录因子^[12,13]。在类风湿性关节炎、结肠炎、哮喘和移植反应等^[5-8]中均可见到 ROR- γ t、IL-17A 和 IL-6 的表达升高。免疫组化显示: 与对照组相比, 模型组的 IL-17A 和 ROR- γ t 蛋白的表达明显升高, 差异有统计学意义, 提示在免疫性肝损伤中存在炎症因子 IL-17 的大量表达。

若想以 Th17 细胞作为一个靶标, 来进一步了解免疫性肝损伤的发病机制并探寻有效的解决途径, 除了关注 Th17 细胞相关的细胞因子有哪些外, 还应关注这些因子通过什么途径干预 Th17 细胞的分化。目前研究表明, 在免疫性脑脊髓膜炎、溃疡性结肠炎、哮喘等^[5-7]疾病中, Tim-3 通路会影响 Th17 细胞的分化, 但在免疫性肝损伤疾病中还未见报道。本实验用 ConA 建造免疫性肝损伤模型, 建模成功后

制备脾淋巴细胞悬液,然后体外用 Tim-3 单克隆抗体来阻断 Tim-3 通路、用配体重组 galectin-9 来激活 Tim-3 通路,72 h 后靶向观察 Th17 细胞相关因子的变化,以此来研究 Tim-3 通路对 Th17 细胞的影响。ELISA 结果显示,与阻断对照组相比,阻断实验组中 IL-17A 和 IL-6 的水平升高 ($P < 0.05$);与激活对照组相比,激活实验组中 IL-17A 和 IL-6 的水平降低 ($P < 0.05$),实时定量 PCR 结果显示,阻断实验组 ROR- γ t mRNA 的表达水平与阻断对照组相比升高 ($P < 0.05$);激活实验组 ROR- γ t mRNA 的表达水平与激活对照组相比降低 ($P < 0.05$),表明在免疫性肝损伤中可能是通过阻断 Tim-3 通路来影响 ROR- γ t mRNA 的表达进而影响炎症因子 IL-17A 的表达。

本研究成功建造了免疫性肝损伤模型并分离出脾淋巴细胞,体外通过阻断或激活 Tim-3 通路来观察其对 Th17 细胞的影响。研究结果让我们进一步明确了免疫性肝损伤的发病机制,为揭示肝损伤发病时免疫紊乱及细胞因子紊乱形成的原因提供了新的思路,并为肝损伤的治疗提供了新的靶标。

参 考 文 献

- [1] Ye C, Li W, Zheng M, et al. T-helper 17 cell: a distinctive cell in liver diseases [J]. *Hepatol Res*, 2011, 41(1): 22-29.
- [2] 张园园, 方肇勤, 王艳明, 等. 不同治疗方案对 H22 肝癌荷瘤小鼠的疗效比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(3): 67-71, 77.
- [3] Liang J, Zhang B, Shen RW, et al. The effect of antifibrotic drug halofugine on Th17 cells in concanavalin A-induced liver fibrosis [J]. *Scand J Immunol*, 2014, 79(3): 163-172.
- [4] Liang J, Zhang B, Shen RW, et al. Preventive effect of halofugine on concanavalin A induced liver fibrosis [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e82232.
- [5] Oomizu S, Arikawa T, Niki T, et al. Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner [J]. *Clin Immunol*, 2012, 143(1): 51-58.
- [6] Rangachari M, Kuchroo VK. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology [J]. *J Autoimmune*, 2013, 9(45): 31-39.
- [7] Li X, Zhao YO, Li CW, et al. T cell immunoglobulin-3 as a new therapeutic target for rheumatoid arthritis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(12): 1145-1149.
- [8] Shi F, Guo X, Jiang X, et al. Dysregulated Tim-3 expression and its correlation with imbalanced CD4 helper T cell function in ulcerative colitis [J]. *Clin Immunol*, 2012, 145(3): 230-240.
- [9] Itoh A, Isoda K, Kondoh M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin A induced liver injury [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(5): 1215-1219.
- [10] 梁洁, 张蓓, 刘佳宝, 等. 刀豆蛋白 A 诱导 Wistar 大鼠肝纤维化模型的建立 [J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(17): 1198-1201.
- [11] Sun HQ, Zhang JY, Zhang H, et al. Increased Th17 cells contribute to disease progression in patients with HBV-associated liver cirrhosis [J]. *J Viral Hepat*, 2012, 19(6): 396-403.
- [12] 张勇, 邢广群, 张蓓, 等. 鲫鱼汤对阿霉素肾病大鼠 Th17 细胞相关炎症因子表达的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(4): 16-20, 3.
- [13] Tan Z, Qian X, Jiang R, et al. IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation [J]. *J Immunol*, 2013, 191(4): 1835-1844.

[收稿日期] 2014-09-22