



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.010
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.010
China Journal of General Surgery, 2023, 32(7):1053-1060.

· 基础研究 ·

LBH与肝纤维化进展及肝内免疫细胞分布的关联研究

黄为, 冯超

(中南大学湘雅三医院 肝胆胰外科, 湖南 长沙 410013)

摘要

背景与目的: 研究发现, 肝内免疫调节与肝纤维化发生发展密切相关。然而, 在肝纤维化中与免疫细胞相关联的关键基因目前仍不清楚。因此, 本研究探讨肝纤维化中的关键基因与疾病进展以及肝内免疫细胞分布的关联。

方法: 基于公共数据库中的不同肝纤维化程度的肝组织 (GSE162694 和 GSE49541), 对转录组测序 RNA-seq 测序数据进行差异表达比较, 以正常肝样本作为对照; 通过相对表达丰度排秩 (REO) 算法结果获得相关逆转稳定基因对; 分析与肝纤维化相关的关键基因。构建 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠模型, Masson 染色鉴定病理组织学改变, qRT-PCR 和 Western blot 方法检测关键基因的 mRNA 与蛋白表达; xCell 工具分析关键基因与免疫细胞、肝纤维化进展的关系。

结果: 分析测序数据获得两个肝纤维化相关的交叠的逆转基因对 (THBS2>RHDE 及 LBH>LRRC19); 其中 THBS2、LBH 均在肝纤维化组织中差异上调, 并且 LBH 表达与肝纤维化分级、组织学评分和炎症评分明显相关 (均 $P<0.05$)。与对照组比较, 模型组小鼠肝脏中 LBH mRNA 及蛋白水平均明显上调 (均 $P<0.05$)。基于 LBH 表达中位值, 将肝纤维化芯片 GSE162694、GSE49541 中的样本分为 LBH 高表达组与 LBH 低表达组, xCell 分析显示, CD4⁺ 记忆 T 细胞、中央记忆 CD8⁺ T 细胞、树突状细胞、aDC、cDC 等免疫细胞富集水平及免疫细胞评分在 LBH 高表达组中均明显上调 (均 $P<0.05$)。

结论: 转录辅助因子 LBH 可能参与调节肝内免疫细胞分布并促进肝纤维化的进展。

关键词

肝纤维化; Limb-bud and Heart; 免疫细胞

中图分类号: R657.3

Association of LBH with the progression of liver fibrosis and the distribution of intrahepatic immune cells

HUANG Wei, FENG Chao

(Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013)

Abstract

Background and Aims: Previous studies have found a close association between intrahepatic immune regulation and the development of liver fibrosis. However, the key genes associated with immune cells in liver fibrosis are still unclear. Therefore, this study aimed to investigate the correlation between key genes in liver fibrosis, disease progression, and the distribution of intrahepatic immune cells.

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2022JJ40743)。

收稿日期: 2022-09-28; **修订日期:** 2023-03-25。

作者简介: 黄为, 中南大学湘雅三医院主治医师, 主要从事肝纤维化方面的研究。

通信作者: 冯超, Email: fengchaoxy@163.com

Methods: Differential gene expression analysis was performed on RNA sequencing data (RNA-seq) from liver tissues with different degrees of liver fibrosis obtained from public databases (GSE162694 and GSE49541), using normal liver samples as controls. The relative expression order (REO) algorithm was used to identify relative reversal stable pairs. Key genes associated with liver fibrosis were analyzed. A CCl₄-induced mouse model of liver fibrosis was established, and histopathological changes were identified using Masson staining. The mRNA and protein expression of key genes were detected using qRT-PCR and Western blot methods, respectively. The relationship between key genes and immune cells as well as the progression of liver fibrosis was analyzed using the xCell tool.

Results: Analysis of the sequencing data identified two overlapping reverse gene pairs associated with liver fibrosis (THBS2>RHDE and LBH>LRRRC19). Both THBS2 and LBH were upregulated in liver fibrosis tissues, and the expression of LBH was significantly correlated with fibrosis stage, histological score, and inflammation score (all $P<0.05$). Compared to the control group, the mRNA and protein levels of LBH in the liver of the model mice were significantly upregulated (both $P<0.05$). Based on the median expression value of LBH, the samples from the liver fibrosis datasets GSE162694 and GSE49541 were divided into the LBH high-expression group and the LBH low-expression group. The xCell analysis revealed that CD4⁺ memory T cells, central memory CD8⁺ T cells, dendritic cells, aDC, cDC, and other immune cells were enriched and immune cell scores were significantly upregulated in the high LBH expression group (all $P<0.05$).

Conclusion: The transcriptional co-factor LBH may regulate the distribution of intrahepatic immune cells and promote the progression of liver fibrosis.

Key words

Hepatic Fibrosis; Limb-bud and Heart; Immune Cells

CLC number: R657.3

肝纤维化是由于病原微生物、化学药物、脂质沉积等多种致病因素刺激，导致的肝细胞损伤后修复再生的过程，表现为细胞外基质在肝脏中弥漫性沉积与异常分布^[1-2]。由于肝纤维化与各种慢性肝病伴随发生，可进一步导致肝硬化和肝癌的发生，肝纤维化严重危害人类健康^[3]。研究^[4]发现，肝内免疫调节与肝纤维化发生发展密切相关。肝星状细胞（hepatic stellate cells, HSC）激活是关键环节，HSC可通过分泌细胞外基质及多个细胞因子和趋化因子，将免疫细胞趋化至浸润损伤部位，介导免疫炎症反应和损伤组织的修复过程，促进肝纤维化进展^[5-6]。且通过靶向抑制HSC激活来治疗肝纤维化取得了很大的进展^[7-8]。

近年来，随着基因芯片技术和高通量测序技术的快速发展，通过基因表达谱数据筛选影响疾病进展的差异表达基因已经逐步成熟，而基于相对表达丰度排秩（relative expression orderings, REO）算法获得的基因则更加稳定^[9]。因此，本研究基于REO算法筛选肝纤维化相关差异表达基因，

并通过CCl₄诱导的肝纤维化小鼠模型进行验证，进一步分析关键基因与免疫细胞的关联，探讨研究其与肝纤维化进展及肝内免疫细胞分布的关联，为治疗肝纤维化提供新的潜在治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性小鼠10只，4周龄，购于湖南斯莱克景达实验动物有限责任公司。将小鼠常规饲养1周后进行实验。本实验经中南大学动物伦理委员会批准（XMXB-2023-0047）。

1.2 主要试剂

CCl₄购自国药集团化学试剂有限公司；TRIzol试剂购自上海源叶生物科技有限公司；逆转录试剂盒购自Promega公司；实时荧光定量PCR试剂盒购自Roche公司，引物以及实验试剂购自上海吉玛生物制药技术有限公司；BCA蛋白质测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司；ECL试剂盒购自上

海天能有限公司。

1.3 方法

1.3.1 GEO数据库肝纤维化相关差异基因比较 基于关键词“Hepatic Fibrosis”在GEO数据库中下载肝纤维化相关基因芯片GSE162694、GSE49541、GSE84044。GSE162694数据集中包括112例不同化阶段的肝纤维化样本及31例正常样本；GSE49541数据集中包括32例重度肝纤维化样本及40例轻度肝纤维化样本；GSE84044数据集中包括124例慢性乙型肝炎合并肝纤维化样本。设置筛选标准为 $P < 0.05$ 和 $|\log \text{FC}| > 2$ 以筛选差异表达基因。

1.3.2 REO算法筛选差异表达基因 REO算法主要分析步骤如下：(1)通过筛选样本中REO高度稳定的基因对。在一个样本中， n 对稳定基因对中出现 $GA < GB$ 的情况 $\leq k$ 次的概率可使用二项分布概率的统计学方法进行计算：

$$P(k, n) = 1 - \sum_{i=n-k}^{n-1} \binom{n}{i} 0.5^i (1 - 0.5)^{n-i}.$$

n 为样本数， k 为 n 个样本中出现 $GA < GB$ 的次数， $P < 0.05$ 定义为稳定基因对。(2)基于稳定基因对，在给定的疾病样本中找出稳定逆转基因对。稳定基因对可产生两种不同的稳定逆转基因对。 $GA < GB$ 和 $GA > GB$ 分别为A类和B类显著稳定基因对，则 (GA, GB) 为稳定逆转基因对。上述二项分布检验计算各类别概率。对于一个类别未知的样本， k 为 $GA > GB$ 的基因秩次关系在稳定逆转基因对中出现的次数， n 为显著稳定基因对的对数。如果 $P(k, n) < 0.05$ ，则该样本显著符合B类的特征，分为B类，如果 $P(n-k, n) < 0.05$ ，则该样本显著符合A类的特征，分为A类。

1.3.3 xCell评分分析免疫细胞富集分布差异 通过单细胞测序xCell网络工具对肝纤维化相关基因芯片样本数据进行细胞类型富集分析，汇总免疫细胞表达数据集，筛选具有统计学意义的免疫细胞($P < 0.05$)，比较各免疫细胞评分差异。

1.3.4 肝纤维化模型构建 随机将10只小鼠分为对照组和模型组，每组各5只。模型组小鼠腹腔注射含有 CCl_4 的橄榄油溶液(1:1)，以0.5 mL/kg的剂量每周注射2次，连续注射4周。对照组小鼠在相同时间间隔使用相同体积的橄榄油进行腹腔注射。末次注射后取小鼠肝脏组织进行HE染色，观察组织病理特征确定造模是否成功^[10]。

1.3.5 Masson染色 4%的多聚甲醛固定小鼠肝脏

组织，经浓度梯度的乙醇进行脱水、二甲苯透明、石蜡进行包埋，将石蜡切为4 μm 厚度，使用二甲苯脱蜡，苏木素染液浸泡5~10 min后1%盐酸分化，流水冲洗5 min后使用Masson染色液染色5~10 min，蒸馏水冲洗，1%磷钨酸液处理5 min，苯胺蓝复染，1%醋酸处理1 min，95%乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。显微镜下观察肝脏组织病理形态^[11]。

1.3.6 荧光定量PCR(qRT-PCR) 使用PBS洗涤肝脏组织样本，用液氮速冻后转移至洁净研钵，将小鼠肝脏组织研磨粉碎，将研磨所得粉末转移至1.5 mL离心管中，使用TRIzol法提取组织中总RNA，检测RNA的浓度和纯度。使用逆转录试剂盒进行逆转录反应合成cDNA，加入引物后使用PCR试剂盒扩增目的基因，分析扩增曲线，使用GAPDH作为内参， $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算目的基因的相对表达量^[12]。

1.3.7 Western blot 将小鼠肝脏组织使用预冷的0.9%氯化钠溶液进行漂洗，用液氮速冻后转移至洁净研钵，研磨粉碎后加入适量PBS，后将混合液吸入1.5 mL离心管中，加入含PMSF的裂解缓冲液并吹打混匀，于冰上裂解30 min，在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，12 000 r/min离心5 min，取上清。使用BCA法检测蛋白浓度。使用预制梯度凝胶从每个样品中加等量的20 μg 蛋白，然后转移到聚偏二氟乙烯膜。用含有5%脱脂牛奶的TBST缓冲液封闭后依次加入一抗、二抗进行孵育，TBST漂洗后使用ECL试剂盒显影，使用Image J软件分析各条带灰度值并进行量化^[13]。

1.4 统计学处理

实验数据由Graphpadprism7.0处理，最终数据由3次独立实验结果的平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计显著性采用LSD- t 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基于REO算法的肝纤维化基因表达差异化分析

通过REO算法分析GSE162694、GSE49541中不同分级的肝纤维化样本及正常肝样本的差异特征，两个芯片各取基因排序前后的top200，最终获得了两个交叠的逆转基因对($\text{THBS2} > \text{TRHDE}$ 及 $\text{LBH} > \text{LRRRC19}$)，在GSE162694和GSE49541芯片中的表达情况(图1)。

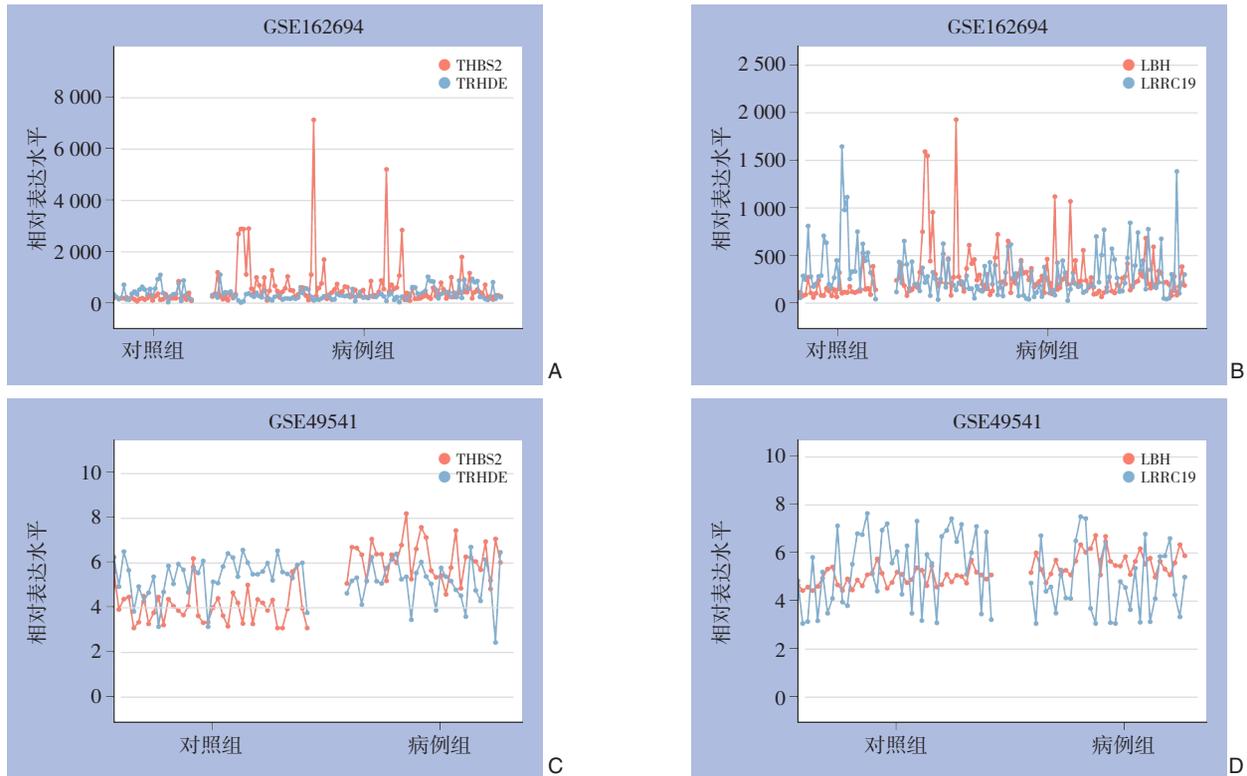


图1 基于REO算法的肝纤维化基因表达差异化分析结果 A: 基因芯片GSE162694中逆转基因对THBS2和TRHDE的表达水平; B: 基因芯片GSE162694中逆转基因对LBH和LRRC19的表达水平; C: 基因芯片GSE49541中逆转基因对THBS2和TRHDE的表达水平; D: 基因芯片GSE49541中逆转基因对LBH和LRRC19的表达水平

Figure 1 Results of differential gene expression analysis in liver fibrosis based on the REO algorithm A: Expression levels of the reverse gene pairs THBS2 and TRHDE in the series GSE162694; B: Expression levels of the reverse gene pairs LBH and LRRC19 in the series GSE162694; C: Expression levels of the reverse gene pairs THBS2 and TRHDE in the series GSE49541; D: Expression levels of the reverse gene pairs LBH and LRRC19 in the series GSE49541

2.2 关键基因在肝纤维化病灶中的表达与疾病进展的关系

通过分析GSE162694、GSE49541芯片中逆转基因对THBS2、TRHDE、LBH、LRRC19的表达情况发现THBS2、LBH均在肝纤维化组织中差异上调,并且LBH表达与肝纤维化分级相关(图2A-B),结合独立数据集GSE84044也观察到LBH的表达随肝纤维化进展逐渐增加(图2C-D),并与组织学评分和炎症评分明显有关(均 $P<0.05$)(图2E-F)。

2.3 动物模型验证LBH在肝纤维化病灶中的表达

通过Masson染色显示,对照组小鼠肝脏组织无异常变化。模型组小鼠可见肝细胞大量坏死,肝脏组织正常结构损坏,纤维组织明显增生(图3A)。

qRT-PCR检测和Western blot检测显示,与对照组比较,模型组小鼠LBH mRNA及蛋白水平均明显上调(均 $P<0.05$)(图3B-C)。

2.4 LBH高表达与肝纤维化的肝内免疫细胞的关系

基于LBH表达中位值,将肝纤维化芯片GSE162694、GSE49541中的样本分为LBH高表达组与LBH低表达组。通过xCell分析发现,CD4⁺记忆T细胞(CD4⁺ memory T-cells)、中央记忆CD8⁺T细胞(CD8⁺Tcm)、树突状细胞(dendritic cells, DC)、aDC、cDC等免疫细胞富集水平及免疫细胞评分在LBH高、低表达组间差异有统计学意义(均 $P<0.05$),且均在LBH高表达组中明显上调(图4)。

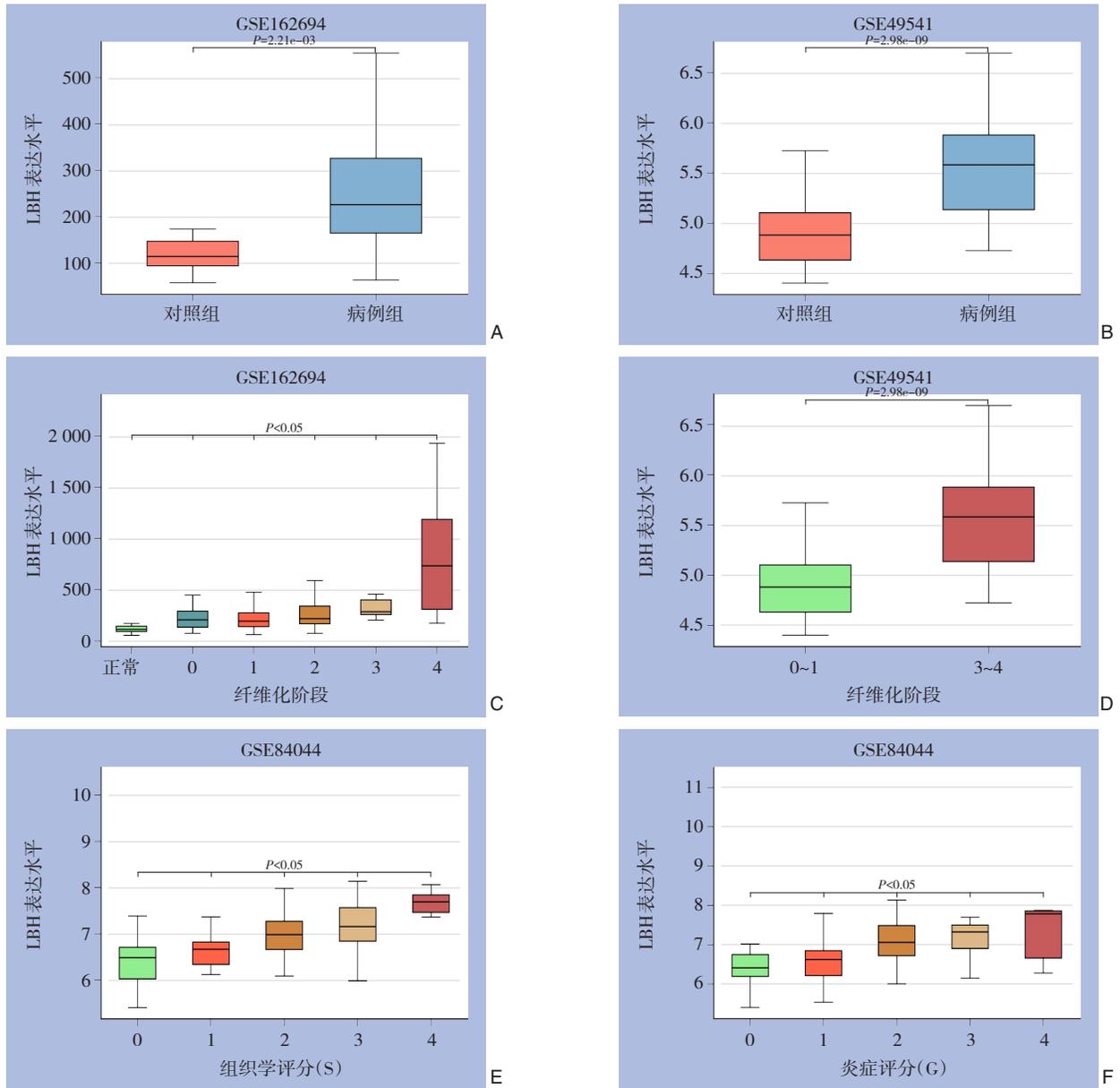


图2 LBH表达与肝纤维化程度及疾病进展的关系 A: 基因芯片GSE162694中LBH的表达水平; B: 基因芯片GSE49541中LBH的表达水平; C: 基因芯片GSE162694中LBH在肝纤维化不同阶段的表达水平; D: 基因芯片GSE49541中LBH在肝纤维化不同阶段的表达水平; E: 基因芯片GSE84044中LBH在不同组织学评分中的表达水平; F: 基因芯片GSE84044中LBH在不同炎症评分中的表达水平

Figure 2 The relationship between LBH expression and the degree of liver fibrosis and disease progression A: Expression levels of LBH in gene chip GSE162694; B: Expression levels of LBH in gene chip GSE49541; C: Expression levels of LBH at different stages of liver fibrosis in gene chip GSE162694; D: Expression levels of LBH at different stages of liver fibrosis in gene chip GSE49541; E: Expression levels of LBH in different histological scores in gene chip GSE84044; F: Expression levels of LBH in different inflammation scores in gene chip GSE84044

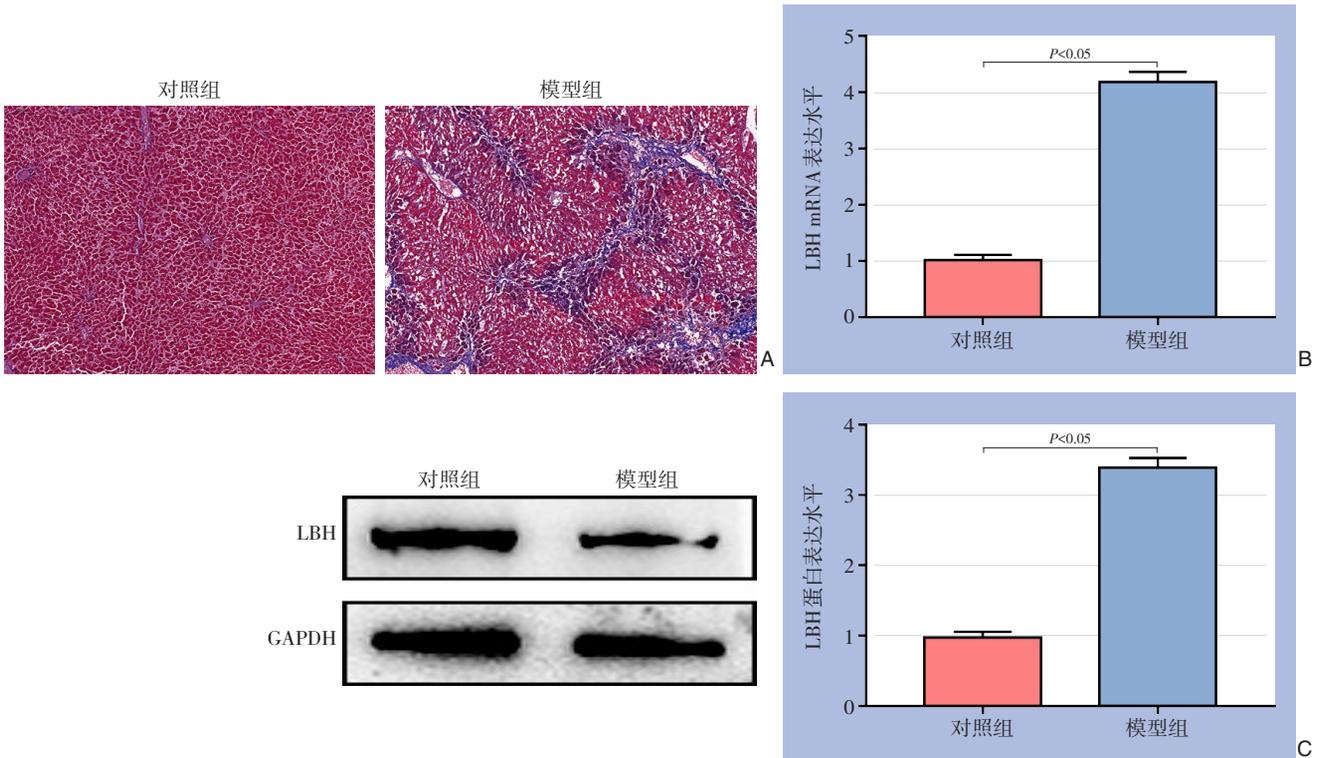


图3 LBH在肝纤维化小鼠模型病灶中的表达 A: 肝脏组织Masson染色(×100); B: qRT-PCR检测LBH mRNA水平; C: Western blot检测LBH蛋白表达水平

Figure 3 Expression of LBH in lesions of the liver fibrosis mouse model A: Liver tissue Masson staining (×100); B: qRT-PCR detection of LBH mRNA levels; C: Western blot detection of LBH protein expression levels

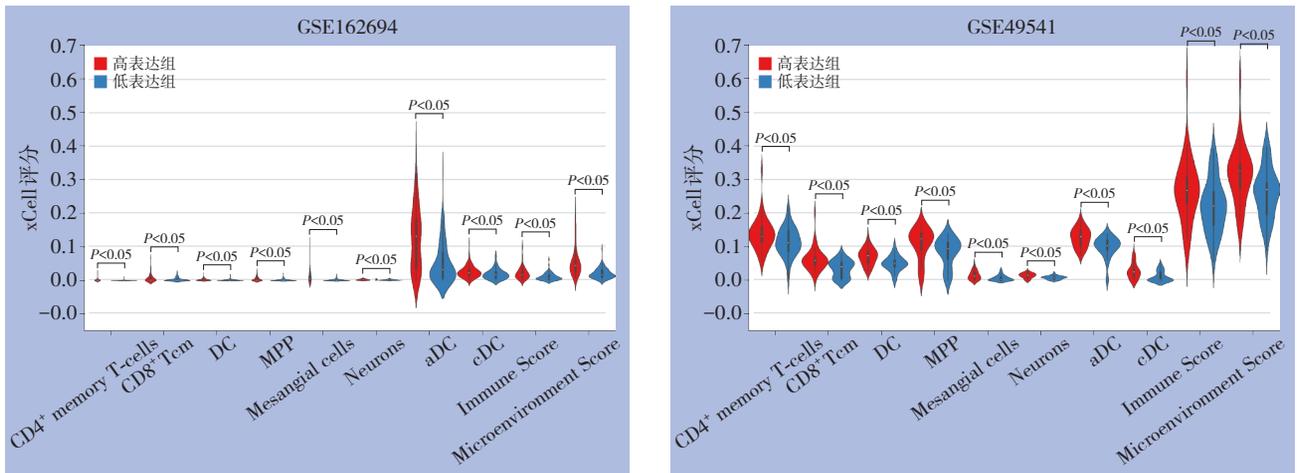


图4 xCell分析不同LBH表达水平肝纤维化病灶中免疫浸润分析

Figure 4 xCell analysis of immunoinfiltration analysis in liver fibrosis at different LBH expression levels

3 讨论

肝纤维化是由于各种原因长期刺激导致的细胞外基质异常沉积,可进展为肝硬化、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),最终导致肝功能的衰竭甚至死亡^[14]。目前,临床上治疗肝纤维化

主要针对病因治疗,尚无有效抗肝纤维化的药物^[6, 15]。肝纤维化程度是诊断和评估慢性肝病的一项重要参考指标^[16],目前,肝脏穿刺活体组织检查是临床诊断的金标准,但由于该项检查具有侵袭性,限制了其广泛的应用^[17]。因此,寻找影响肝纤维化的潜在靶点对于临床诊断及治疗肝纤维

化具有深远意义。

通过疾病相关基因芯片筛选差异基因的分析方法已经广泛应用于寻找影响疾病进展的基因,基于REO建立的转录组定性标志则更加稳定,同一标准可用于不同样本进行个性化分析,解决定量标志存在的问题。本研究首先基于REO算法筛选出两个与肝纤维化相关的交叠的逆转基因对,进一步基因芯片分析发现LBH在肝纤维化病灶高表达并与疾病进展相关,动物实验中也显示LBH在肝纤维化病灶高表达。转录辅助因子LBH是一个序列高度保守的组织特异性转录共活化因子,在胚胎发育中起到重要作用^[18]。研究^[19-20]发现, LBH可促进心脏成纤维细胞的增殖及上皮-间充质转化过程,还可通过外泌体促进心肌成纤维细胞的活化,诱导心脏纤维化,可能是心肌纤维化的一个潜在治疗靶点,但其在肝纤维化中的作用尚未被阐明。Chen等^[21]通过收集226例接受手术治疗的HCC患者相关病例,发现LBH蛋白在HCC中存在高表达,且不利于患者的良好预后,是HCC潜在的预后标志物。因此推测, LBH可能与肝纤维化也存在密切关联。

肝内免疫调节与肝纤维化发展密切相关。髓样细胞表达触发受体(triggering receptors expressed on myeloid cells, TREM)家族是免疫球蛋白超家族的一个受体家族,包括五个家族成员:TREM1、TREM2、TREM3和TREM样转录物TLT1和TLT2^[22]。在肝脏中, TREM1和TREM2在HSC、巨噬细胞和中性粒细胞上均有表达,可以被募集到炎症部位,与常驻免疫细胞一起参与先天免疫调节^[23-24]。临床研究^[25]显示,肝纤维化患者先天性免疫受体TREM-1阳性的Kupffer细胞和巨噬细胞对肝纤维化区域的浸润显著增加。M1极化巨噬细胞的细胞疗法通过调节肝脏微环境来募集和修饰内源性巨噬细胞和自然杀伤(NK)细胞的活化,从而改善肝内免疫微环境,阻碍肝纤维化发生^[26]。HSC激活是肝纤维化发生发展的关键阶段,激活后可释放大量的ECM、细胞因子及趋化因子,参与机体炎症反应^[14, 27]。动物实验表明在肝纤维化模型中, CD8⁺T、CD4⁺T细胞显著上调, CD8⁺T其中以CCR5吸引HSC诱导HSC凋亡,促进肝纤维化恢复^[28], CD4⁺T细胞通过释放促炎因子加剧肝纤维化^[29]。上述研究表明,肝内免疫细胞分布与肝纤维化发生发展密切相关,且已有研究^[30]证实LBH参与机体

免疫调节过程,与多个炎症性疾病的发生发展均有密切关联。因此,本研究进一步通过xCell等工具分析LBH与免疫细胞、肝纤维化进展关系。结果发现CD4⁺记忆T细胞、中央记忆CD8⁺T细胞、树突状细胞、aDC、cDC等免疫细胞富集水平及免疫细胞评分在LBH高表达组中显著上调。分析结果与上述研究结论一致,肝纤维化患者肝内免疫细胞分布发生变化,且与LBH的表达水平密切相关,即LBH可能通过调控机体的免疫细胞在肝纤维化进展中发挥关键作用。

综上所述, LBH可能通过调节肝内免疫细胞分布促进肝纤维化的进展,为临床治疗肝纤维化提供新的科学依据。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:黄为提出研究选题,设计研究方案及目标,实施研究过程,采集数据,统计分析,起草及修订论文;冯超负责技术、材料支持,指导,终审论文。

参考文献

- [1] Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 37-55. doi: 10.1016/j.mam.2018.09.002.
- [2] Yang F, Li H, Li Y, et al. Crosstalk between hepatic stellate cells and surrounding cells in hepatic fibrosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99:108051. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108051.
- [3] Wang S, Friedman SL. Hepatic fibrosis: a convergent response to liver injury that is reversible[J]. *J Hepatol*, 2020, 73(1): 210-211. doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.011.
- [4] Cai XY, Wang JJ, Wang JC, et al. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: new insights into therapy[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155: 104720. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104720.
- [5] Khanam A, Saleeb PG, Kottlilil S. Pathophysiology and treatment options for hepatic fibrosis: can it be completely cured?[J]. *Cells*, 2021, 10(5):1097. doi: 10.3390/cells10051097.
- [6] Friedman SL, Pinzani M. Hepatic fibrosis 2022: Unmet needs and a blueprint for the future[J]. *Hepatology*, 2022, 75(2): 473-488. doi: 10.1002/hep.32285.
- [7] Poilil Surendran S, George Thomas R, Moon MJ, et al. Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12:6997-7006. doi: 10.2147/IJN.S145951.
- [8] Ullah A, Wang KK, Wu P, et al. CXCR4-targeted liposomal mediated co-delivery of pirfenidone and AMD3100 for the

- treatment of TGF β -induced HSC-T6 cells activation[J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14:2927–2944. doi: [10.2147/IJN.S171280](https://doi.org/10.2147/IJN.S171280).
- [9] Cheng ML, Nakib D, Perciani CT, et al. The immune niche of the liver[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2021, 135(20):2445–2466. doi: [10.1042/CS20190654](https://doi.org/10.1042/CS20190654).
- [10] Arroyo N, Villamayor L, Díaz I, et al. GATA4 induces liver fibrosis regression by deactivating hepatic stellate cells[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(23):e150059. doi: [10.1172/jci.insight.150059](https://doi.org/10.1172/jci.insight.150059).
- [11] Lee ES, Kwon MH, Kim HM, et al. Curcumin analog CUR5-8 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in mice with high-fat diet-induced obesity[J]. *Metabolism*, 2020, 103: 154015. doi: [10.1016/j.metabol.2019.154015](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.154015).
- [12] Kyritsi K, Kennedy L, Meadows V, et al. Mast cells induce ductular reaction mimicking liver injury in mice through mast cell-derived transforming growth factor beta 1 signaling[J]. *Hepatology*, 2021, 73(6):2397–2410. doi: [10.1002/hep.31497](https://doi.org/10.1002/hep.31497).
- [13] Wang SS, Sheng FY, Zou L, et al. Hyperoside attenuates non-alcoholic fatty liver disease in rats via cholesterol metabolism and bile acid metabolism[J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 109–122. doi: [10.1016/j.jare.2021.06.001](https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.06.001).
- [14] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3):151–166. doi: [10.1038/s41575-020-00372-7](https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7).
- [15] Eftekhari A, Arjmand A, Asheghvatan A, et al. The potential application of magnetic nanoparticles for liver fibrosis theranostics[J]. *Front Chem*, 2021, 9: 674786. doi: [10.3389/fchem.2021.674786](https://doi.org/10.3389/fchem.2021.674786).
- [16] Wu ZC, Liu XY, Liu JY, et al. Preparation of betulinic acid galactosylated chitosan nanoparticles and their effect on liver fibrosis[J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17:4195–4210. doi: [10.2147/IJN.S373430](https://doi.org/10.2147/IJN.S373430).
- [17] O'Shea A, Pierce TT. US elastography in hepatic fibrosis—Radiology in training[J]. *Radiology*, 2021, 299(2): 264–271. doi: [10.1148/radiol.2021203893](https://doi.org/10.1148/radiol.2021203893).
- [18] Liu LT, Luo QL, Xu Q, et al. Limb-bud and heart development (LBH) contributes to glioma progression in vitro and in vivo[J]. *FEBS Open Bio*, 2022, 12(1): 211–220. doi: [10.1002/2211-5463.13325](https://doi.org/10.1002/2211-5463.13325).
- [19] Xu Y, Wu A, Chen J, et al. Limb-bud and heart (LBH) upregulation in cardiomyocytes under hypoxia promotes the activation of cardiac fibroblasts via exosome secretion[J]. *Mediators Inflamm*, 2022, 2022:8939449. doi: [10.1155/2022/8939449](https://doi.org/10.1155/2022/8939449).
- [20] Wu A, Zhang L, Chen J, et al. Limb-bud and Heart (LBH) mediates proliferation, fibroblast-to-myofibroblast transition and EMT-like processes in cardiac fibroblasts[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(7):2685–2701. doi: [10.1007/s11010-021-04111-7](https://doi.org/10.1007/s11010-021-04111-7).
- [21] Chen J, Huang C, Chen K, et al. Overexpression of LBH is associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:441–448. doi: [10.2147/OTT.S152953](https://doi.org/10.2147/OTT.S152953).
- [22] Sun H, Feng J, Tang L. Function of TREM1 and TREM2 in liver-related diseases[J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2626. doi: [10.3390/cells9122626](https://doi.org/10.3390/cells9122626).
- [23] Perugorria MJ, Esparza-Baquer A, Oakley F, et al. Non-parenchymal TREM-2 protects the liver from immune-mediated hepatocellular damage[J]. *Gut*, 2019, 68(3):533–546. doi: [10.1136/gutjnl-2017-314107](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314107).
- [24] Esparza-Baquer A, Labiano I, Sharif O, et al. TREM-2 defends the liver against hepatocellular carcinoma through multifactorial protective mechanisms[J]. *Gut*, 2021, 70(7): 1345–1361. doi: [10.1136/gutjnl-2019-319227](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319227).
- [25] Nguyen-Lefebvre AT, Ajith A, Portik-Dobos V, et al. The innate immune receptor TREM-1 promotes liver injury and fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(11):4870–4883. doi: [10.1172/JCI98156](https://doi.org/10.1172/JCI98156).
- [26] Ma PF, Gao CC, Yi J, et al. Cytotherapy with M1-polarized macrophages ameliorates liver fibrosis by modulating immune microenvironment in mice[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(4):770–779. doi: [10.1016/j.jhep.2017.05.022](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.022).
- [27] Caligiuri A, Gentilini A, Pastore M, et al. Cellular and molecular mechanisms underlying liver fibrosis regression[J]. *Cells*, 2021, 10(10):2759. doi: [10.3390/cells10102759](https://doi.org/10.3390/cells10102759).
- [28] Koda Y, Teratani T, Chu PS, et al. CD8⁺ tissue-resident memory T cells promote liver fibrosis resolution by inducing apoptosis of hepatic stellate cells[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4474. doi: [10.1038/s41467-021-24734-0](https://doi.org/10.1038/s41467-021-24734-0).
- [29] Zhou YF, Zhang HB, Yao Y, et al. CD4⁺ T cell activation and inflammation in NASH-related fibrosis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:967410. doi: [10.3389/fimmu.2022.967410](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.967410).
- [30] Wang Y, Shi Y, Zhang X, et al. Overexpression of Limb Bud and Heart Alleviates Sepsis-Induced Acute Lung Injury via Inhibiting the NLRP3 Inflammasome [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 4084371. doi: [10.1155/2021/4084371](https://doi.org/10.1155/2021/4084371).

(本文编辑 熊杨)

本文引用格式: 黄为, 冯超. LBH与肝纤维化进展及肝内免疫细胞分布的关联研究[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(7):1053–1060. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.010](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.010)

Cite this article as: Huang W, Feng C. Association of LBH with the progression of liver fibrosis and the distribution of intrahepatic immune cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(7): 1053–1060. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.010](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.010)