

四氯化碳诱导小鼠肝脏纤维化的差异蛋白质组学

郭改改^{1,3,4}, 吴红星^{2,3}, 刘明伟³, 丁琛^{3,4}, 秦钧^{3,4}, 杨晓明³

1 安徽医科大学病理生理学教研室, 安徽 合肥 230032

2 浙江大学生命科学研究院, 杭州 浙江 310058

3 国家蛋白质组学重点实验室 北京蛋白质组研究中心, 北京 102206

4 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850

郭改改, 吴红星, 刘明伟, 等. 四氯化碳诱导小鼠肝脏纤维化的差异蛋白质组学. 生物工程学报, 2014, 30(7): 1105-1114.

Guo GG, Wu HX, Liu MW, et al. Differential proteome analysis of carbon tetrachloride-induced mouse liver fibrosis. Chin J Biotech, 2014, 30(7): 1105-1114.

摘要: 以四氯化碳 (Carbon tetrachloride, CCl₄) 诱导小鼠肝组织纤维化为研究模型, 发现并探讨纤维化肝组织与正常肝组织在蛋白质组水平上的差异。实验小鼠 (C57 BL/6) 随机分为两组, 由橄榄油和四氯化碳诱导 15 周, 并分别对这两组肝组织的全蛋白表达谱进行质谱检测, 应用 GO (Gene Ontology) 功能分类分析和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 信号通路的富集分析方法对鉴定到的全蛋白表达谱进行差异表达分析。在对照组和实验组中, 我们分别鉴定到 17 382 和 20 486 条特异性肽段, 图谱平均利用率大于 50%, 共计鉴定到蛋白 4 991 种 (蛋白特异性肽段个数至少为 1), 其中差异表达蛋白有 2 135 种 (差异倍数大于或等于 2), 表达上调蛋白 1 264 种, 下调蛋白 871 种。纤维化肝脏组织中与细胞外基质组成 (Extracellular matrix organization)、细胞骨架组成 (Cytoskeleton organization)、有机磷酸代谢 (Organophosphate metabolic process)、细胞定位 (Cellular localization) 和细胞组分调节 (Regulation of cellular component organization) 相关蛋白的表达是上调的; 另外, 与小分子代谢 (Small molecule metabolic process)、蛋白质转运 (Protein transport) 和有机氮化合物的代谢 (Organonitrogen compound metabolic process), 以及四吡咯的合成过程 (Tetrapyrrole biosynthetic process) 有关蛋白的表达是下调的。信号通路富集分析结果表明, 纤维化与 VEGF 和 T 细胞受体信号调节通路密切相关。结果提示, 纤维化的形成不仅是一个复杂的信号转导过程, 更是一个炎症与免疫相互促成的结果; 增强肝实质细胞的存活, 降低相关信号的传递及接收都有可能对纤维化的发生和发展起到抑制效果。

关键词: 四氯化碳, 肝脏组织纤维化, 蛋白质组学

Received: February 25, 2014; **Accepted:** May 6, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31170779).

Corresponding author: Xiaoming Yang. E-mail: xmyang2@nic.bmi.ac.cn

Jun Qin. E-mail: jqin@bcm.edu

国家自然科学基金 (No. 31170779) 资助。

Differential proteome analysis of carbon tetrachloride-induced mouse liver fibrosis

Gaigai Guo^{1,3,4}, Hongxing Wu^{2,3}, Mingwei Liu³, Chen Ding^{3,4}, Jun Qin^{3,4}, and Xiaoming Yang³

1 Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, China

2 College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

3 Beijing Proteome Research, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing 102206, China

4 Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: To explore the differential proteome pattern in mouse fibrosis liver in comparison to wild type. Mice were fed with carbon tetrachloride or olive oil vehicle for 15 weeks. Mouse livers from both groups were collected and submitted to MS platform for proteome screening. GO (Gene Ontology) biological process and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway enrichment analysis were used to analyze differentially expressed proteins. As the results, we identified 17 382 and 20 486 unique peptides in control and carbon tetrachloride-induced groups, respectively. A total of 4 991 proteins (at least 1 unique peptide matched) were identified, of which 2 135 were differentially expressed (≥ 2 fold). In fibrosis mouse liver 1 264 proteins were up regulated and 871 proteins were down regulated. Proteins associated with DNA replication, cell cycle, ECM-receptor interaction, and spliceosome were significantly increased in carbon tetrachloride-induced group. Proteins associated with small molecule metabolic process, protein transport, organonitrogen compound metabolic process, and tetrapyrrole biosynthetic processes were down regulated in carbon tetrachloride-induced mouse liver fibrosis tissue. Bioinformatics findings showed that fibrosis was closely related to the regulation of VEGF and T cell receptor signaling pathway, and further suggested that liver fibrosis was a complex signal transduction process that many biological processes such as liver metabolism, inflammation, and immune response are involved. Based this study, we can envision that protection of protein metabolism in liver parenchymal cells and blocking of inflammatory signaling transduction may be beneficial for liver fibrosis therapy.

Keywords: carbon tetrachloride, liver fibrosis, proteomics

从世界范围来看, 饮酒、肝炎病毒感染和非酒精性脂肪性肝炎是促使肝组织慢性损伤发展形成纤维化、肝硬化和肝癌的三大主要原因^[1]。纤维化的肝脏组织内细胞外基质蛋白 (Extracellular matrix proteins, ECM) 明显增多, 例如: 胶原蛋白 I、III 和 IV、纤维连接蛋白、弹性蛋白、层粘连蛋白、透明质酸和蛋白多糖等, 这些蛋白主要是由肝星形细胞 (Hepatic stellate cells, HSCs) 和其分化形成的肌纤维样母细胞分泌而来^[2-5]。静止期的 HSC 细胞, 储存大量的维甲酸, 并合成胶质纤维酸性蛋白质, 处于激活状态下

的 HSC 细胞, 逐步分化形成肌纤维样母细胞, 胞内储存的维甲酸和新合成的胶质纤维酸性蛋白质不断减少, 同时合成大量胞外基质蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)。细胞外基质积累最初形成结节, 随着肝组织内部结构的改变进而发展形成肝硬化, 并伴随肝功能障碍的产生^[6]。

四氯化碳模型常用于肝脏纤维化治疗药物评估^[1,7,8]。氧存在条件下, 四氯化碳被还原, 氯原子与碳原子间化学键发生断裂, 形成多种氧自由基, 引起细胞膜、核酸、功能蛋白等大分

子的过氧化反应。早在 20 世纪 70 年代,就有研究显示肝纤维形成是一个可逆化过程^[9], Schaffner 等也证明肝纤维化是慢性肝损伤发展进程中最后一个可逆化病理应答阶段^[10-11]。本研究以四氯化碳诱导小鼠肝脏组织纤维化为模型,探讨纤维化肝脏组织与正常肝组织在蛋白质组水平上的差异。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组

纯系、雄性 8 周至 10 周龄 C57 BL/6 小鼠(北京华阜康生物科技股份有限公司) 10 只,体重为 (20±2) g,随机平均分为两组,一组为对照组,腹部皮下注射橄榄油进行处理,另一组为实验组,腹部皮下注射四氯化碳(溶解于橄榄油)进行诱导。

1.1.2 试剂

CCl₄ 购自北京化学试剂公司,橄榄油购自 Sigma 公司,乙腈和水购自 Avantor Performance Materials 公司,Masson 染色试剂盒购自北京中山金桥公司。

1.1.3 主要仪器

Rigol-L3000 高效液相色谱(北京普源精电科技有限公司),Nano LC-ultra 高效液相色谱(Eksigent 公司),Triple-TOF 5600 Plus (AB SCIEX 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 纤维化动物模型

诱导剂为含 40%四氯化碳的橄榄油溶液,诱导期间一周注射两次,第 1 次以每 100 g 小鼠体重,按 0.5 mL 的计量进行皮下注射,第 2 次以 0.3 mL 的计量进行注射,诱导期限为 15 周^[12]。

1.2.2 纤维化鉴定

小鼠肝组织进行石蜡包埋与组织切片,应用 Masson 染色方法进行病理学鉴定^[13]。

1.2.3 蛋白样品制备、分离与质谱鉴定

肝组织样品 0.5 g,8 mol/L Urea 裂解液中充分裂解;各组中包含的 5 只小鼠肝脏组织分别提供 80 μg 蛋白样品,合并后进行还原烷基化(共计 400 μg),加入二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)至终浓度为 1 mmol/L,56 °C 反应 30 min;冷却后,加入碘乙酰胺(Iodoacetamide, IAA)至终浓度为 2 mmol/L,避光反应 30 min;再次加入 DTT 至终浓度为 1 mmol/L,避光反应 15 min;向反应体系中加入 1 mmol/L CaCl₂、5 倍体积 25 mmol/L Tris (pH 8.2) 和 8 μg 胰蛋白酶,37 °C,消化 8-12 h。

肽段样品首先用 Rigol-L3000 高效液相色谱进行第一次分离,溶液 A:水-乙腈(V/V=98/2);溶液 B:水-乙腈(V/V=2/98),NH₃·H₂O 调节 pH 10。色谱柱类型:AGELA C18,5 μm,150 Å,4.6 mm×250 mm;柱温 45 °C,流速 1 mL/min,液相中 A 在不同时间点所含比例(A/A+B)为:95% (0 min)、88% (5 min)、78% (21 min)、68% (32 min)、10% (36 min)、95% (40 min),每组共计接收 40 个级分,其中 30 个为有效级分。

1.2.4 蛋白质的定性与定量

将第一次分离所得的 30 个级分分别溶解于 100 μL 溶液 C 中,12 000 r/min,离心 10 min,取上清,相邻 3 个样品合并后进行第二次分离和蛋白鉴定,蛋白样品上样载量为 1 μg。肽段样品第二次分离中溶液 C:水-乙腈-甲酸(V/V/V=98/1.9/0.2),溶液 D:乙腈-水-甲酸(V/V/V=98/1.9/0.2),pH 3。第二次分

离中溶液 C 在不同时间点所含比例 (C/C+D) 为: 95% (0 min)、92% (5 min)、77% (21 min)、47% (55 min)、37% (65 min)、5% (75 min), 喷雾电压 2.5 kV, 毛细管温度为 RT, 碰撞能量为 Rolling CE(系统根据一级质谱信息, 及预设参数自动调整), 一级采集质量范围: 350–1 250 Da, 二级采集质量范围: 100–1 500 Da, 富集柱类型: 自制, 填料 C18, 填料直径 5 μm , 柱内径 100 μm , 长 20 mm, 分离柱类型: 自制, 填料 C18, 填料直径 3 μm , 柱内径 75 μm , 长 120 mm, 流速: 330 nL/min, 系统柱压: 4 000 PSI。

搜索引擎: ProteinPilot Software Beta (4.2), 数据库: NCBI_Mus musculus Ref-seq (34 361 proteins, updated on 07-04-2012), 一级误差: 10 ppm, 二级误差: 20 ppm。

我们应用基于强度的绝对定量方法 (Intensity based absolute quantification, or iBAQ)^[14-15], 对鉴定到的蛋白质进行定量, 依照两组内 iBAQ 值之间的比值对特定蛋白的表达变化进行评定。

2 结果

2.1 四氯化碳诱导肝脏组织纤维化模型

随机分配的两组小鼠中, 对照组注射橄榄油进行诱导, 实验组注射四氯化碳 (溶剂为橄榄油) 进行诱导。在肝脏组织纤维化模型建立过程中, 一周期限之内, 实验对象接受诱导剂注射次数为两次, 诱导持续时间为 15 周。在进行蛋白质组学分析之前, 首先对实验组和对照组肝脏组织的纤维化程度进行病理学鉴定 (图 1A)。两组肝组织的 Masson 染色结果显示, 在四氯化碳诱导小鼠的肝脏组织染色结果中, 由 Masson 染色的胶原蛋白 (呈蓝色) 明显比对照组肝脏组织的胶原蛋白多。另外, 该结果还显示, 胶

原蛋白主要分布于细胞外基质中, 并且成纤维状态存在, 表明四氯化碳诱导 15 周致使小鼠肝脏纤维化形成 (图 1B)。

2.2 组织全蛋白表达谱分析

在进行差异表达蛋白谱分析之前, 样品首先进行高效液相色谱分离, 随后, 对实验组和对照组肝脏组织的蛋白质表达全谱进行质谱鉴定, 其中, 对照组小鼠肝脏组织全蛋白表达谱鉴定结果中, 10 个组分质谱扫描谱图的平均利用率 >50%, 得到高可信度肽段共计 17 382; 实验组中, 谱图的平均利用率 >50%, 得到的高可信度肽段共计 20 486; 两组共计鉴定到 4 991 种蛋白 (特异性肽段数量大于或等于 1), 其中对照组鉴定到 4 527 种蛋白, 实验组鉴定到 4 797 种蛋白 (图 2A)。另外, 差异表达蛋白有 2 135 种, 实验组中, 表达上调的蛋白有 1 264 种 (与对照组的 iBAQ 比值大于或等于 2), 表达下调的蛋白 (与对照组的 iBAQ 比值小于 0.5) 有 871 种 (图 2B)。

2.3 差异表达蛋白谱分析

首先, 我们对表达上调的 1 264 种蛋白和表达下调的 871 种蛋白进行了 GO 生物功能富集分析, 结果显示, 表达上调的蛋白除了具有细胞外基质组成功能 (Extracellular matrix organization) 以外, 还具有细胞骨架组成 (Cytoskeleton organization)、有机磷酸代谢 (Organophosphate metabolic process) 的功能; 另外, 四氯化碳诱导组中, 表达下调的蛋白在小分子代谢 (Small metabolic process)、蛋白质转运 (Protein transport) 和有机氮化合物的代谢 (Organonitrogen compound metabolic process), 以及四吡咯的合成过程 (Tetr-apyrrole biosynthetic process) 有明显的富集现象 (图 3A 和 3B, 附表 2)。

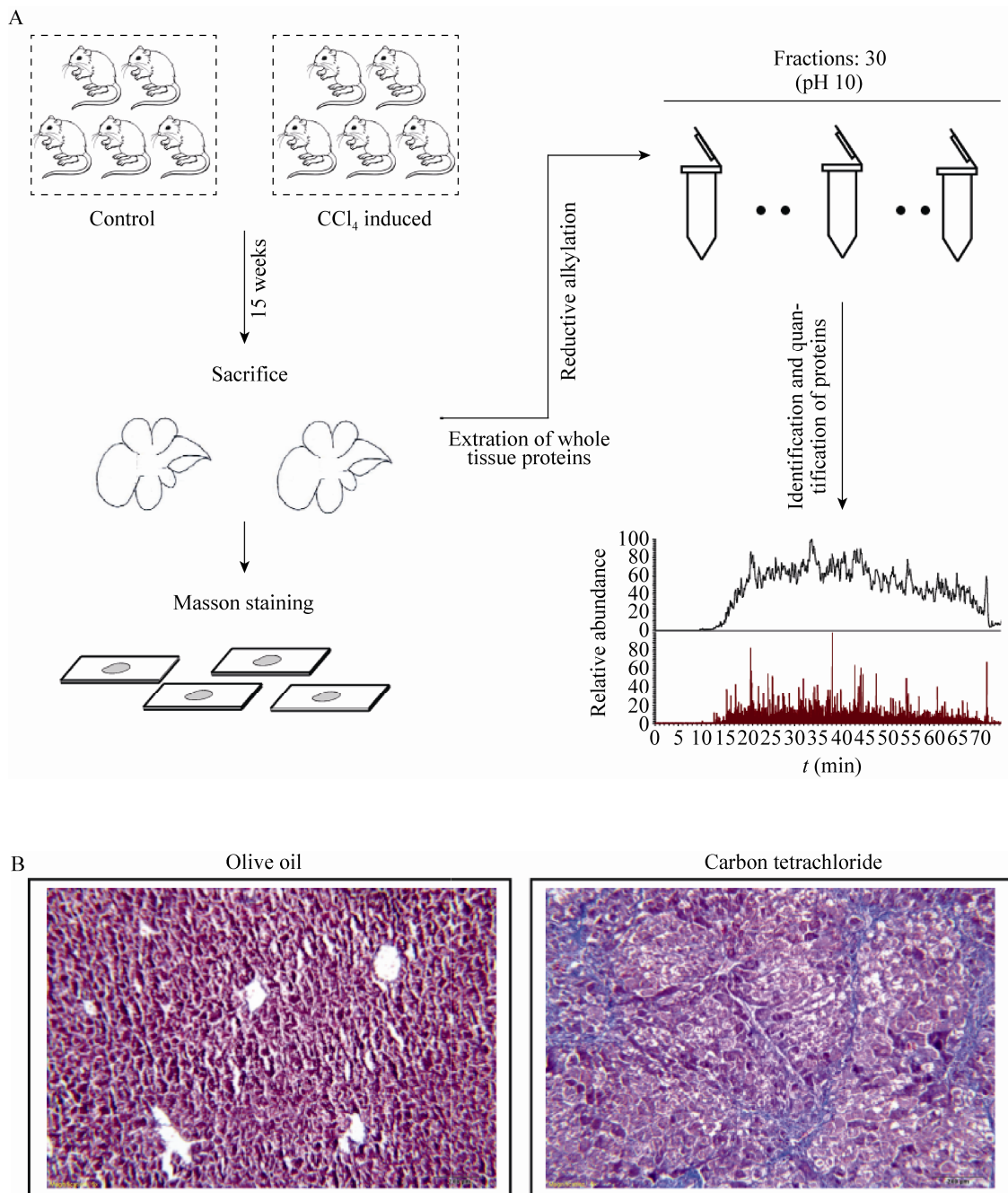


图 1 对照组与四氯化碳诱导组小鼠肝脏组织中全蛋白表达谱的鉴定流程 (A) 及肝脏组织纤维化病理学鉴定 (B)

Fig. 1 A workflow for proteome screening of CCl₄-induced and control liver (A) and pathological analysis of liver fibrosis (B).

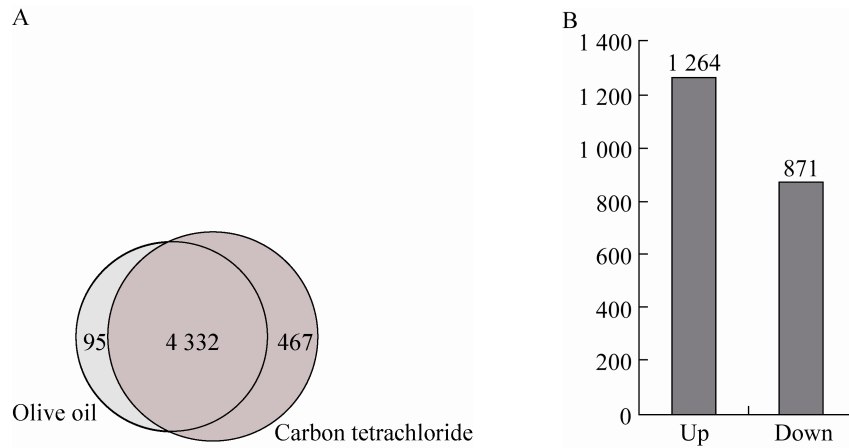


图 2 两组肝脏组织中全蛋白表达谱的蛋白鉴定数量 (A) 和四氯化碳诱导肝脏组织中差异表达蛋白的数量(B)
Fig. 2 General view of liver proteome identified by MS platform in two groups (A) and Differentially expressed proteins in CCl₄-induced mouse liver tissue compared to control group (B).

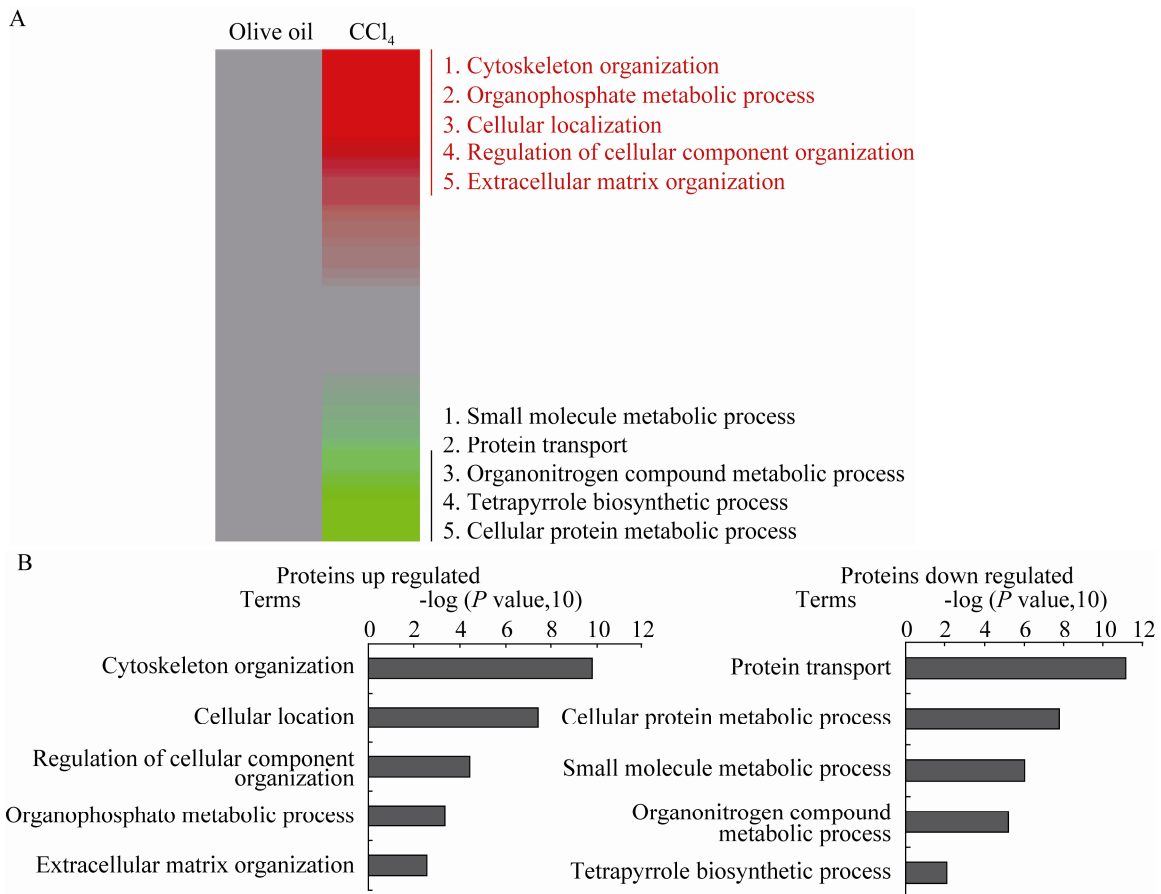


图 3 四氯化碳诱导小鼠肝脏组织中差异表达蛋白的 GO_BP 富集分析 (A) 及其统计学分析 (B) ($P < 0.01$)
Fig. 3 GO_BP enrichment analysis of differentially expressed proteins in CCl₄-induced mouse liver tissue (A) and its statistical analysis (B). $P < 0.01$.

2.4 表达上调蛋白的信号通路分析

为了对纤维化肝组织代谢特征得到更进一步的认识,我们对在纤维化肝组织中差异表达蛋白调节的信号通路进行了分析,上调表达的

1 264 种蛋白的 KEGG 信号通路分析结果显示,实验组中与 VEGF、T 细胞受体、B 细胞受体和 Toll 样受体等信号通路相关蛋白有明显的上调趋势(图 4A、4B),提示四氯化碳诱导的肝纤

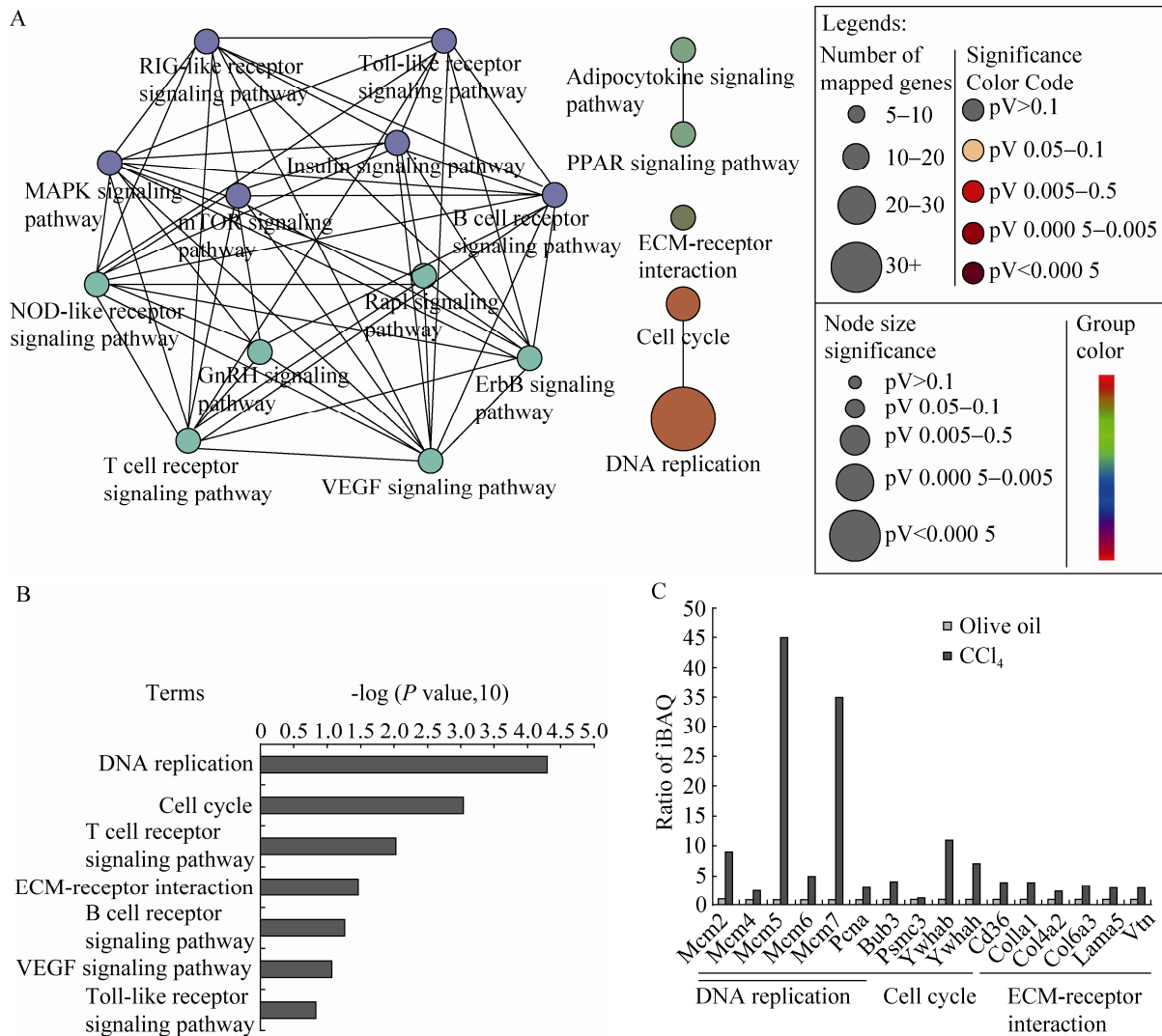


图 4 表达上调蛋白的信号通路富集分析(A: 四氯化碳诱导小鼠组织中上调表达蛋白的 KEGG 信号通路富集分析; B: 四氯化碳诱导小鼠肝脏组织上调表达蛋白中显著富集通路的统计学分析; C: DNA 复制、细胞周期和细胞外基质-受体相互作用信号通路中鉴定到的蛋白在两组中的表达量)

Fig. 4 Enrichment analysis of signaling pathways in up-regulated proteins. (A) KEGG_pathway enrichment analysis of up regulated proteins in CCl₄-induced mouse liver tissue. (B) Statistical analysis of KEGG_pathways enriched in up regulated proteins in CCl₄-induced mouse liver tissue. (C) Relative abundance of identified proteins that belong to DNA replication, cell cycle and ECM-receptor interaction in two groups.

维化过程与免疫系统中天然免疫和获得性免疫均密切相关，与 Park^[1]、Iredale^[5]和 Radaeva 等^[16]的研究结果相符。另外，四氯化碳诱导组中 DNA 复制、细胞周期和细胞外基质-受体相互作用这 3 个信号通路有显著的富集现象(图 4C)，提示，纤维化进程中，肝实质细胞或是非实质细胞经历了再生和增殖的过程，而这一现象可能与细胞外基质-受体相互作用是相联系的。

2.5 表达下调蛋白的信号通路分析

对表达下调的 871 种蛋白进行 KEGG 信号通路分析，我们发现，从信号通路鉴定蛋白数量上看，四氯化碳诱导组中发现有 20 种属于剪切体的蛋白表达是下调的(图 5A)，提示，纤维化后，肝脏细胞内大量功能蛋白质的结构和表达发生变化，这很可能与蛋白在 mRNA 水平的剪切结果有关。另外，从信号通路相关蛋白的鉴定概率 (Number of mapped genes) 来看，与

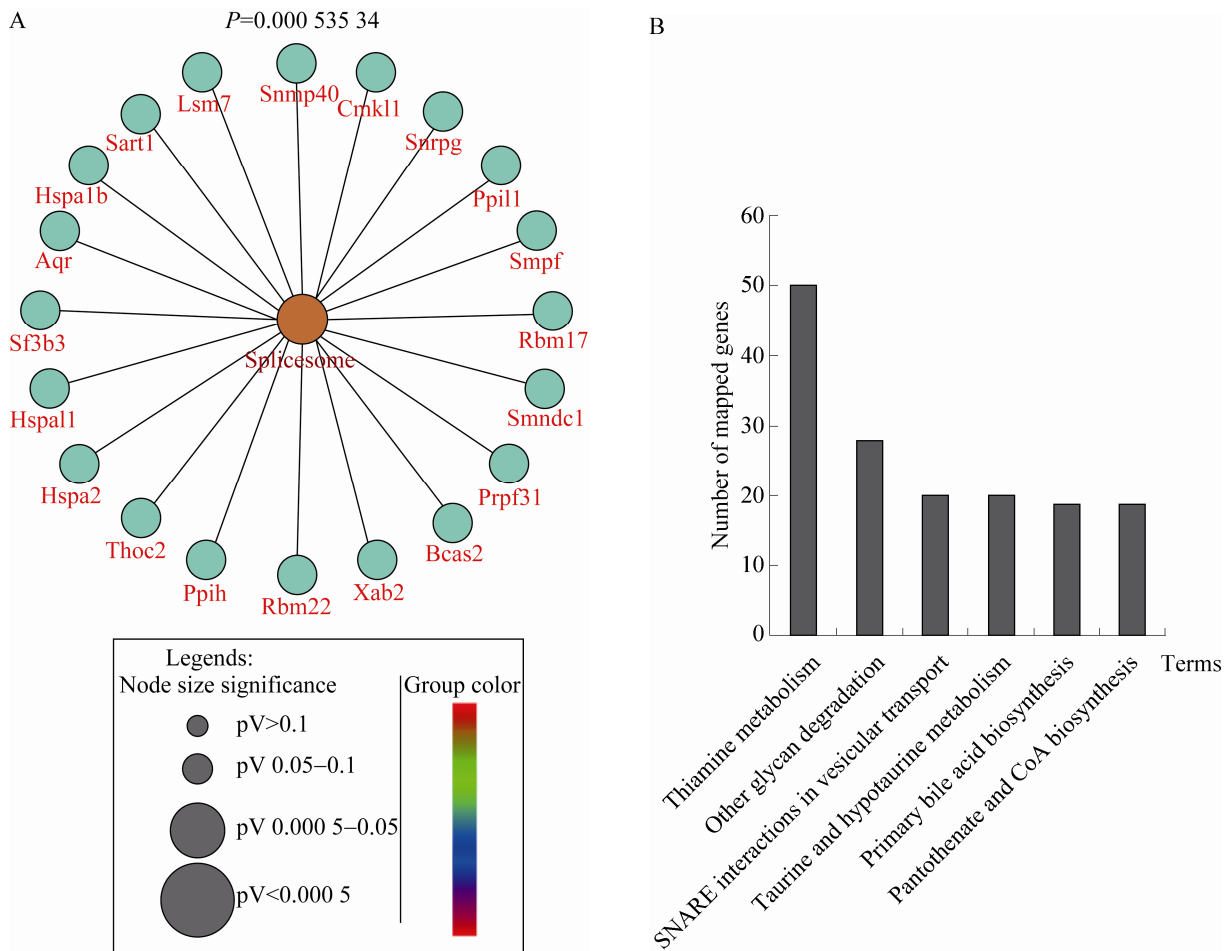


图 5 表达下调蛋白的信号通路分析(A: 四氯化碳诱导小鼠组织中下调表达蛋白的 KEGG 信号通路富集分析; B: 四氯化碳诱导小鼠肝脏组织下调表达蛋白中显著富集信号通路鉴定到的蛋白数量)

Fig. 5 Enrichment analysis of signaling pathways in down-regulated proteins. (A) KEGG_pathway enrichment analysis of proteins down regulated in CCl₄-induced mouse liver tissue. (B) Protein identifications of down regulated pathways in CCl₄-induced mouse liver tissue.

硫胺素代谢(Thiamine metabolism)、聚糖降解(Other glycan degradation)、SNARE 相关囊泡运动(SNARE interactions in vesicular transport)、牛磺酸和亚牛磺酸代谢(Taurine and hypotaurine metabolism)、初级胆酸合成(Primary bile acid biosynthesis)以及泛酸与 CoA 的合成(Pantothenate and CoA biosynthesis)通路相关蛋白的富集度都高于 18%，其中在硫胺素代谢通路里的蛋白覆盖率达到 50% (图 5B)。硫胺素属于胞内诸多代谢酶类的辅酶^[17]；硫胺(维生素 B1)缺乏症能够导致人类特定脑区域和实验动物模型局灶性脑坏死^[18]，同时，Giada^[19]等在对大鼠模型中的研究结果，也证明硫胺素缺乏会引起氧化氮的产生减少、血管功能异常。综合以上研究结果显示，纤维形成可能与肝组织和神经细胞代谢功能异常是密切相关的，另外，血管循环系统的功能异常有可能与纤维形成过程相关。

3 讨论

20 世纪 90 年代至今，质谱应用已经从同位素发现和鉴定，扩展到生物研究领域，它的飞跃发展，使得解决大规模覆盖生物蛋白质组问题成为可能^[20]。目前，蛋白质组学策略中倾向于采用预分级分离和延长 HPLC/MS/MS 鉴定梯度的手段，来克服样品的复杂性问题^[21]，但这些常用方法实验周期长、成本高。而本研究串联使用高效液相反相色谱，对肽段样品进行两次分离，不仅使样品复杂度得到降低，还令工作效率得到提升^[22]。

我们选用四氯化碳诱导的肝纤维化模型进行研究，首次提出纤维形成不仅与 VEGF 信号通路相关，还与 T 细胞受体、B 细胞受体和 Toll 样受

体信号通路等多个通路的激活密切联系。同时，纤维化肝组织中，与细胞外基质-受体相互作用有关的诸多蛋白的表达有明显上调现象，因此，我们提出，纤维化形成最初可能是“纤维诱导信号”向正常组织或细胞的传入过程，例如：肝实质细胞坏死、炎症细胞的聚集或是 HSC 细胞的过度激活，即包括细胞因子的信号传导作用也包含膜受体的信号接收过程。因此，降低细胞外基质与肝组织内不同类型细胞的相互作用，中断胞外信号向正常肝细胞内部的转导，理论上，会对纤维化的发展起到一定的治疗作用。

肝纤维化已成为威胁人类健康的重要问题之一^[23]。肝脏组织受到药物、酒精或物理等损伤后，枯否氏细胞、肝实质细胞、胆管细胞、和 T 细胞等多种细胞之间通过信号传导作用，迅速构成炎性微环境^[24]，这种微环境刺激静止期的肝脏星形细胞 HSC 分化发育形成肌纤维样母细胞，激活的肌纤维样母细胞具有表达平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和多种胞外基质蛋白的特性，并最终促进纤维化的形成^[25-27]。总而言之，纤维化中出现不同类型细胞的异常激活与增殖现象，我们的研究结果首次从蛋白质组学角度上证明，四氯化碳诱导的肝纤维化与 DNA 复制以及细胞周期相关蛋白的表达相关，由此得出，如果从保护肝实质细胞的角度来进行药物筛选，也将有可能缓解肝纤维化的进程。

REFERENCES

- [1] Park O, Jeong WI, Wang L, et al. Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology*, 2009, 49(5): 1683–1694.
- [2] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 2005, 115(2): 209–218.
- [3] Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the

- dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*, 2007, 117(3): 539–548.
- [4] Friedman SL, Rockey DC, Bissell DM. Hepatic fibrosis 2006: report of the third AASLD single topic conference. *Hepatology*, 2007, 45(1): 242–249.
- [5] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655–1669.
- [6] Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 2008, 88(1): 125–172.
- [7] Ma JQ, Ding J, Zhang L, et al. Ursolic acid protects mouse liver against CCl₄-induced oxidative stress and inflammation by the MAPK/NF- κ B pathway. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 37(3): 975–983.
- [8] Li W, Wu Y, Zhu C, et al. Anti-fibrosis effects of Huisheng oral solution in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rat. *Indian J Pharmacol*, 2014, 46(2): 216–221.
- [9] Soyer MT, Ceballos R, Aldrete JS, et al. Reversibility of severe hepatic damage caused by jejunoileal bypass after reestablishment of normal intestinal continuity. *Surgery*, 1976, 79(5): 601–604.
- [10] Schaffner F, Klion FM. Chronic hepatitis. *Annu Rev Med*, 1968, 19: 25–38.
- [11] Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis*, 2001, 5(2): 315–334, v–vi.
- [12] Wasser S, Tan CE. Experimental models of hepatic fibrosis in the rat. *Ann Acad Med*, 1999, Singapore. 28: 109–111.
- [13] Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol*, 2011, 7: 548.
- [14] Nakamura T, Sakata R, Ueno T, et al. Inhibition of transformin growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology*, 2000, 32(2): 247–255.
- [15] Michael JP. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology*, 2002, 122: 1525–1528.
- [16] Radaeva S, Sun R, Jaruga B, et al. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology*, 2006, 130(2): 435–452.
- [17] Liu S, Miriyala S, Keaton MA, et al. Metabolic effects of acute thiamine depletion are reversed by rapamycin in breast and leukemia cells. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e85702.
- [18] Hamada S, Hirashima H, Imaeda M, et al. Thiamine deficiency induces massive cell death in the olfactory bulbs of mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2013, 72(12): 1193–1202.
- [19] Giada CR, Capettini LS, Cruz JS, et al. Thiamine deficiency leads to reduced nitric oxide production and vascular dysfunction in rats. *Nutr Metab Cardiovas Dis*, 2014, 24(2): 183–188.
- [20] Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol*, 2011, 7: 548.
- [21] Thakur SS, Geiger T, Chatterjee B, et al. Deep and highly sensitive proteome coverage by LC-MS/MS without prefractionation. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(8): M110. 003699.
- [22] Ding C, Jiang J, Wei JY, et al. A fast workflow for identification and quantification of proteomes. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(8): 2370–2380.
- [23] Zhao Q, Feng Y, Jia X, et al. Proteome analysis of hepatic non-parenchymal cells of immune liver fibrosis rats. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(3): 303–314.
- [24] Friedman SL. Liver fibrosis--from bench to bedside. *J Hepatol*, 2003, 38(Suppl 1): S38–53.
- [25] Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut*, 2002, 50(6): 891–896.
- [26] Liu C, Gaca MD, Swenson ES, et al. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells: constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem*, 2003, 278(13): 11721–11728.
- [27] Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*, 2004, 39(2): 273–278.

(本文责编 郝丽芳)