

TGF- β 1 激活肝星状细胞并促进血管 内皮细胞新生血管形成

金鑫 毛熙贤 艾麦提·牙森 陈梓昕 李德卫*

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016)

摘要 该研究旨在探讨转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)在肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)激活中的机制以及活化HSCs促进内皮细胞血管新生(angiogenesis)的作用效果。运用qRT-PCR检测 α -SMA、Smad2/3、VEGFA和TGF- β 1-RI的mRNA水平; Western blot检测 α -SMA、Smad2/3、p-Smad2/3、VEGFA和TGF- β 1-RI的蛋白质水平; 基质胶(matrigel)血管形成实验检测活化HSCs的促人脐静脉血内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)血管形成作用。TGF- β 1作用后的HSCs高表达 α -SMA以及经典的TGF- β 1/TGF- β 1-RI/Smad2/3信号通路下游相关的TGF- β 1-RI和Smad2/3等, 具备了活化表型并能促进内皮细胞血管新生。结果表明, TGF- β 1信号通过经典的Smad2/3通路激活了HSCs, 使激活后的HSCs通过分泌VEGFA具备了促进内皮细胞血管新生的功能。

关键词 肝星状细胞; TGF- β 1; Smad2/3; VEGFA; 血管新生

TGF- β 1 Activated Hepatic Stellate Cells Induce Angiogenesis of Vascular Endothelial Cells

Jin Xin, Mao Xixian, Aimaiti Yasen, Chen Zixin, Li Dewei*

(Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the mechanism of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) in the activation of hepatic stellate cells (HSCs), and promoting effect of active HSCs on the angiogenesis. The mRNA levels of α -SMA, Smad2/3, VEGFA and TGF- β 1-RI were determined by qRT-PCR; the protein levels of α -SMA, Smad2/3, VEGFA and TGF- β 1-RI were determined by Western blot; the proangiogenic effect of activated hepatic stellate cells (HSCs) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was detected by Endothelial Cell Tube Formation Assay. TGF- β 1 induced hepatic stellate cells (HSCs) can high express α -SMA and the downstream signal molecules of classical TGF- β 1/TGF- β 1-RI/Smad2/3 signaling pathways, while the HSCs get its proangiogenic potential. The study showed that TGF- β 1 signaling activated HSCs through the classical Smad2/3 pathway, and the activated HSCs have the function of promoting the angiogenesis of vascular endothelial cells.

Keywords hepatic stellate cells (HSCs); TGF- β 1; Smad2/3; VEGFA; angiogenesis

收稿日期: 2017-12-12 接受日期: 2018-01-30

国家自然科学基金(批准号: 81470898)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89011191, E-mail: lidewei406@sina.com

Received: December 12, 2017 Accepted: January 30, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81470898)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011191, E-mail: lidewei406@sina.com

网络出版时间: 2018-04-17 10:51:32

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180417.1051.002.html>

由于供肝短缺,肝细胞移植作为能替代肝脏某项或全部功能的新型治疗策略(已经在一些疾病中有所应用),在终末期肝脏疾病行原位肝移植中起到了桥接作用,为供体肝脏的等待争取了时间^[1],而肝细胞移植后血管化不足成为影响其能存活的重要因素^[2-3]。血管新生区别于血管发生,指以出芽方式从已有血管或血管内皮细胞分支形成的血管^[4],是组织修复中血管形成的主要方式。在病变肝纤维化的过程中,早期存在血管形成,称为肝纤维化相关血管新生,活化肝星状细胞(activated hepatic stellate cells, aHSCs)是主要因素之一^[5-6]。另有一项研究报道,生理情况下,HSCs能转化为肌纤维细胞并有可能参与了肝血管生成^[7],从而考虑使用活化的HSCs联合肝细胞移植促进血管形成,从而营养移植的肝细胞。激活前的星状细胞以一种静息的状态存在于正常肝脏中,在受损肝脏中,TGF- β 1的表达量会上调,HSCs随即受到激活^[8]。所以,TGF- β 1可能是激活HSCs的关键细胞因子,但其具体机制不详。本文主要探讨了TGF- β 1激活HSCs的可能机制以及活化的HSCs在体外促进血管新生的可能途径。探索活化HSCs促进肝细胞移植后血管形成,从而提高肝细胞移植成功率的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠肝星状细胞株(mHSC-T25)购自北京北纳创联生物技术公司BNCC细胞库;人脐静脉血内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)由重庆医科大学附属第一医院实验研究中心肝胆外科潘龙博士惠赠。

1.2 试剂及仪器

DMEM/F12培养基购自美国HyClone公司;胎牛血清(FBS)购自德国PAN-Biotech GmbH公司;青霉素/链霉素双抗、0.25%胰蛋白酶消化液、DAPI、RIPA蛋白质裂解液、PMSF、预染蛋白质Marker、蛋白质上样缓冲液及DEPC水均购自上海碧云天生物技术有限公司;Trizole、SYBR[®] Green I及RNA逆转录试剂盒购自大连TaKaRa公司;兔抗小鼠 α -SMA单抗(ab32575)、兔抗小鼠VEGFA单抗(ab1316)兔抗人CD34单抗(ab81289)购自美国Abcam公司;兔抗小鼠TGF- β 1-RI、兔抗小鼠p-Smad2/3购自沈阳万类生物科技有限公司;兔抗GAPDH多克隆IgG

抗体(AB-P-R001)购自杭州贤至生物科技有限公司;HRP标记的山羊抗兔IgG二抗购自Abclonal公司;绿色荧光标记山羊抗兔二抗购自Abbkine公司;基质胶(Matrigel 356234)购自美国Corning公司;嘌呤霉素C购自美国Sigma公司;包装完备的pHBLV-CMVIE-TGF- β 1、pHBLV-CMVIE-GFP、pHBLV-CMVIE-TGF- β 1shrna3、pHBLV-CMVIE-RFP慢病毒质粒购自中国汉恒生物科技有限公司;低温高速离心机购自美国Sigma公司;荧光定量PCR仪FTC2000购自Canada公司;CelDoc2000凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司;倒置相差显微镜购自日本Olympus公司。

1.3 细胞培养

mHSC-T25及HUVECs均使用内含10%灭活新生小牛血清及100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM/F12完全培养基,置于37 $^{\circ}$ C、5.0% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。每1~2天换液,2~3天传代,传代时使用0.25%胰蛋白酶消化细胞2~3 min,DMEM/F12完全培养基终止反应,以1:3进行传代。

1.4 TGF- β 1过表达组、TGF- β 1受体敲低组及各自对照组病毒转染及稳定株的建立

提前1天以 2.5×10^5 /mL的密度将mHSC-T25细胞接种于6孔板,分别取200 μ L慢病毒pHBLV-CMVIE-TGF- β 1、pHBLV-CMVIE-GFP、pHBLV-CMVIE-TGF- β 1shrna3及pHBLV-CMVIE-RFP感染mHSC-T25细胞;感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10,感染24 h后换新鲜培养基,继续培养24 h后用嘌呤霉素(4 mg/L)进行筛选,以建立稳定细胞株。筛选完成后,用荧光显微镜观察细胞GFP绿色荧光表达及其形态学的改变。4组稳定株分别对应的为TGF- β 1过表达组、GFP空载病毒组、TGF- β 1敲低组、RFP空载病毒组,分别简称为T、GFP、R1、RFP。

1.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测各组细胞目的基因的mRNA水平

用Trizol试剂分别提取T、GFP、R1、RFP 4组细胞的总mRNA,使用TaKaRa反转录试剂盒,按说明书将各组反转录为cDNA。反转录条件为:42 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s, 4 $^{\circ}$ C 10 min。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C预变性4 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 循环39次;72 $^{\circ}$ C检测信号。统计数据,根据 Δ Ct值($C_{qGAPDH} - C_{q内参}$)统计出的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值为该基因相对表达水平。本实验中,所有引物均由TaKaRa公司合成(表

表1 qRT-PCR中用到的引物
Table 1 primers used for qRT-PCR analysis

基因名 Gene name	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)
<i>TGF-β1</i>	GAG GCG GTG CTC GCT TTG TA	CGT TGT TGC GGT CCA CCA TTA	63
<i>TGF-β-RI</i>	TTA TGA GAG AAT GCT GGT ATG CC	CCT TCC TGT TGG CTG AGT TGT	60
α -SMA	GGC ATC CAC GAA ACC ACC TA	CGT CGT ATT CCT GTT TGC TGA T	60
<i>VEGFA</i>	TGT TCA GAG CGG AGA AAG CAT	ACG TTC GTT TAA CTC AAG CTG C	60
<i>Smad2</i>	CCA GGT CTC TTG ATG GTC GT	TGA TAA ACG GCC TCA AAA CC	57
<i>Smad3</i>	TGA CAG TGC TAT TTT CGT CCA GTC T	CGA TCC CTT TAC TCC CAG TGT CT	57
<i>GAPDH</i>	GTG CTG AGT ATG TCG TGG AGT CT	AGT CTT CTG GGT GGC AGT GA	61

1)。

1.6 Western blot法检测各组细胞目的蛋白质的水平

按照蛋白质提取试剂盒说明书,使用RIPA裂解液提取各组总蛋白质,采用BCA法测定蛋白质浓度并统一蛋白浓度为30 μ g/mL。各组蛋白质等体积上样,进行SDS-PAGE分离,然后电转至PVDF膜。5%高钙脱脂奶粉摇床上封闭2 h。分别滴加兔抗小鼠 α -SMA(1:1 500稀释)、兔抗小鼠VEGFA(1:200稀释)、兔抗小鼠TGF- β -RI(1:500稀释)、兔抗小鼠p-Smad2/3(1:500稀释)兔抗小鼠GAPDH多克隆抗体(1:500稀释),4 $^{\circ}$ C过夜;TBST洗3次,加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:5 000稀释),37 $^{\circ}$ C孵育1 h;TBST漂洗3次,滴加ECL曝光显影,测得的目的蛋白质和内参蛋白质的灰度值之比为蛋白质分子相对表达水平。

1.7 基质胶小管形成实验

普通HSC组(control, C)、TGF- β 1过表达组(T)、TGF- β 1敲低组(R1)细胞提前以无血清培养液培养,24 h后收集其上清液用于后续实验各组的条件培养液;以每孔50 μ L的量铺基质胶加于96孔板中,放入37 $^{\circ}$ C细胞培养箱内30 min,备用。在铺好基质胶的96孔板中按 3×10^4 /孔接种血清饥饿24 h后的HUVECs,并设置3个平行复孔;6 h后在倒置显微镜下观察基质胶上HUVECs形成的小管并拍照;用ImageJ对采集的图片进行分析,计数新生血管的长度。

1.8 免疫荧光检测CD34鉴定形成的小管为新生血管

对新生小管行免疫荧光染色,吸弃培养液,用PBS洗3次,每次3 min,4%多聚甲醛固定10 min后,再用PBS洗3次,每次3 min,加入10%正常山羊血清100 μ L/孔,封闭1 h后加入抗血管内皮细胞标志物CD34的一抗,4 $^{\circ}$ C过夜后,PBS洗3次,每次3 min,避

光加入荧光二抗孵育1 h,PBS洗3次,每次3 min,最后DAPI染核,荧光显微镜下拍照采集图片。

1.9 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功建立T组、GFP组、R1组及RFP组稳定感染的小鼠HSCs

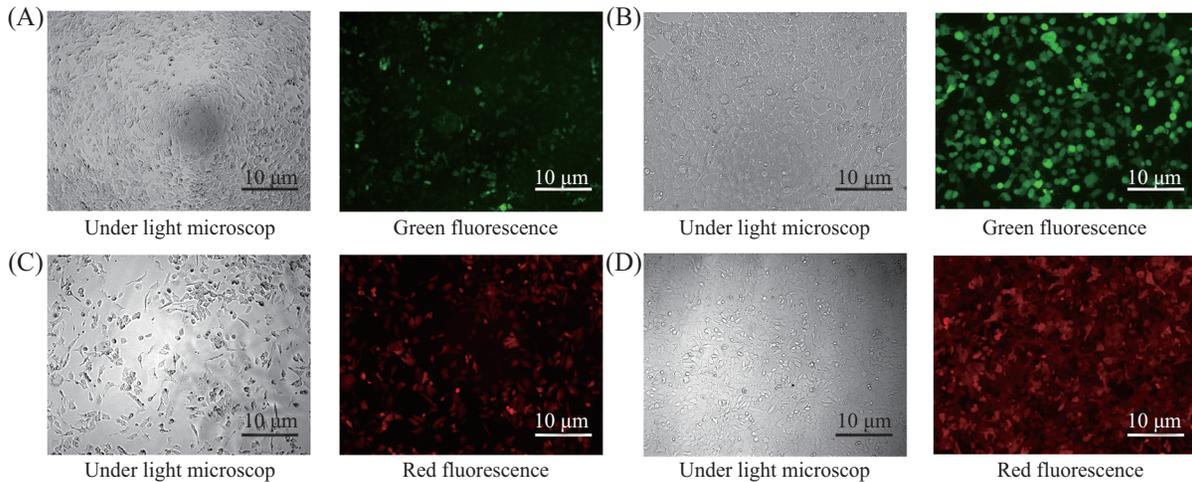
将4组病毒浓缩液感染正常小鼠HSCs(mHSC-T25),3天后于倒置荧光显微镜下观察,感染效率约为50%。使用嘌呤霉素对各组细胞进行筛选,14天左右形成稳定表达绿色荧光和红色荧光的稳定细胞集落(图1)。细胞进行单克隆扩大培养后,建立了稳定表达TGF- β 1基因的小鼠HSCs(T组)、低表达TGF- β 1基因的小鼠HSCs(R1组)和其对应空载病毒对照组(GFP组、RFP组)。

2.2 过表达TGF- β 1的小鼠HSCs能高表达TGF- β 1及其活化状态标志物 α -SMA

用qRT-PCR分别检测了4组细胞中TGF- β 1及HSCs活化标志物 α -SMA的mRNA水平。结果显示,TGF- β 1过表达组二者水平较对照组明显升高,且敲低组二者水平则相对于对照组明显降低(图2A),Western blot与PCR结果一致(图2B),验证了病毒转染的成功率,同时说明转染成功后高表达TGF- β 1的小鼠HSCs得到了活化。

2.3 病毒转染后的HSCs高表达经典TGF- β 1信号通路下游相关分子TGF- β 1-RI、Smad2/3,且分泌VEGFA增多

qRT-PCR检测结果显示,活化后HSCs中经典的TGF- β 1信号通路相关的下游信号分子TGF- β 1-RI、

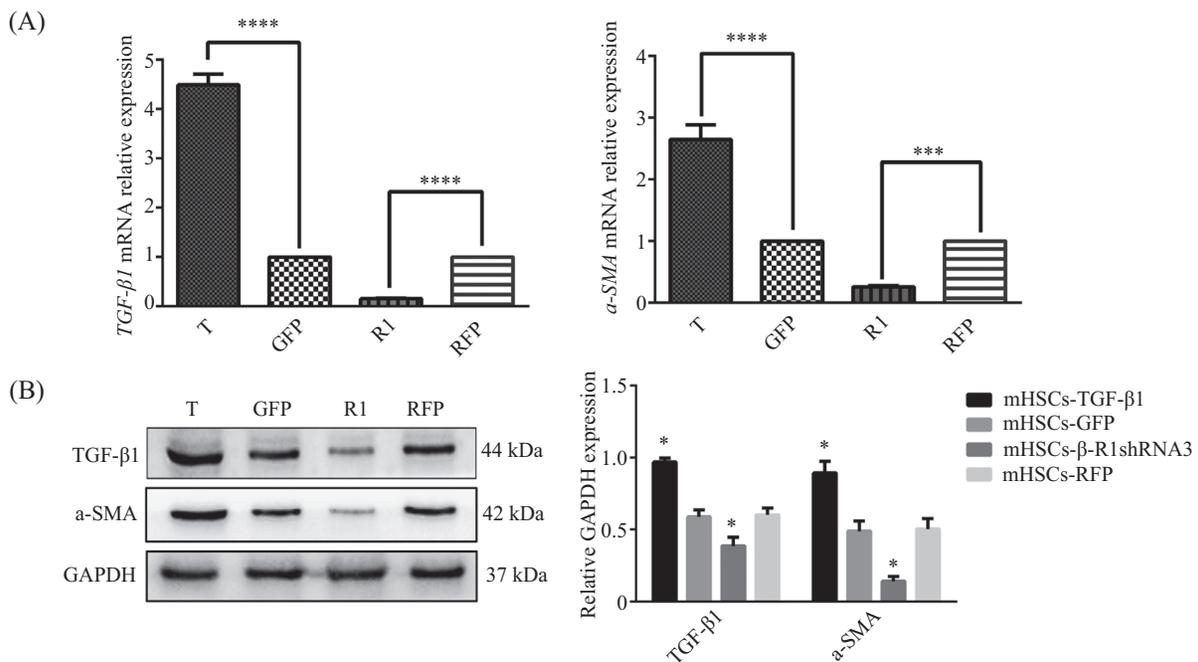


A: pHBLV-CMVIE-TGF- β 1组病毒感染后的mHSC-T25细胞光镜下与荧光显微镜下绿光对比; B: pHBLV-CMVIE-GFP组空载病毒感染后的mHSC-T25细胞光镜下与荧光显微镜下绿光对比; C: pHBLV-CMVIE-TGF- β R1shrna3组病毒感染后的mHSC-T25细胞光镜下与荧光显微镜下红光对比; D: pHBLV-CMVIE-RFP组空载病毒感染后的mHSC-T25细胞光镜下与荧光显微镜下红光对比。

A: mHSC-T25 after transfected with pHBLV-CMVIE-TGF- β 1 under fluorescence microscope; B: mHSC-T25 after transfected with pHBLV-CMVIE-GFP under fluorescence microscope; C: mHSC-T25 after transfected with pHBLV-CMVIE-TGF- β R1shrna3 under fluorescence microscope; D: mHSC-T25 after transfected with pHBLV-CMVIE-RFP under fluorescence microscope.

图1 病毒转染14天后HSCs荧光情况

Fig.1 Fluorescence in HSCs after transfection of virus for 14 d



A: qRT-PCR法检测TGF- β 1和 α -SMA mRNA相对水平; B: Western blot法检测TGF- β 1和 α -SMA蛋白质相对水平。* P <0.05, *** P <0.001, **** P <0.0001, 与对照组相比较。

A: mRNA levels of TGF- β 1 and α -SMA determined by qRT-PCR; B: protein levels of TGF- β 1 and α -SMA determined by Western blot. * P <0.05, *** P <0.001, **** P <0.0001 vs control group.

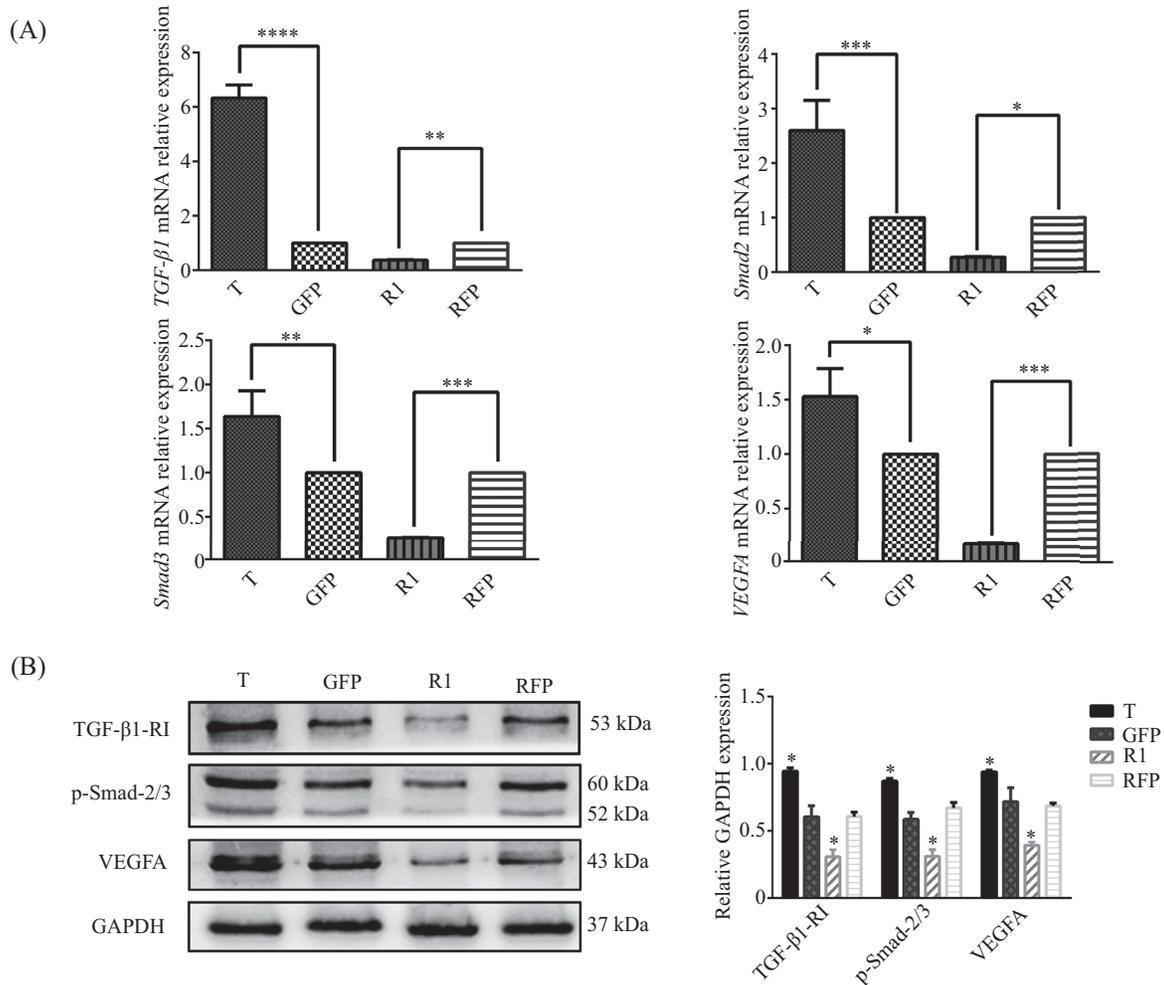
图2 病毒转染鉴定及HSCs激活情况

Fig.2 Identification of virus transfection and the activation of HSCs

Smad2/3 mRNA及促血管形成关键细胞因子*VEGFA* mRNA水平上调(图3A)。此外, Western blot检测结果同时显示, 各指标相应蛋白质水平也明显增高(图3B)。

2.4 活化HSCs能促进人脐静脉血内皮细胞(HUVECs)血管新生

采用基质胶小管形成实验检测3组HSCs上清



A: qRT-PCR法检测TGF- β 1/Smad2/3信号通路相关分子及VEGFA mRNA水平; B: Western blot法检测TGF- β 1/Smad2/3信号通路相关分子及VEGFA蛋白质水平。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001, 与对照组相比较。

A: mRNA levels of TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway related molecules and VEGFA determined by qRT-PCR; B: protein levels of TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway related molecules and VEGFA determined by Western blot. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001 vs control group.

图3 活化HSCs内TGF- β 1-Smad2/3信号通路激活状态和表达VEGFA情况

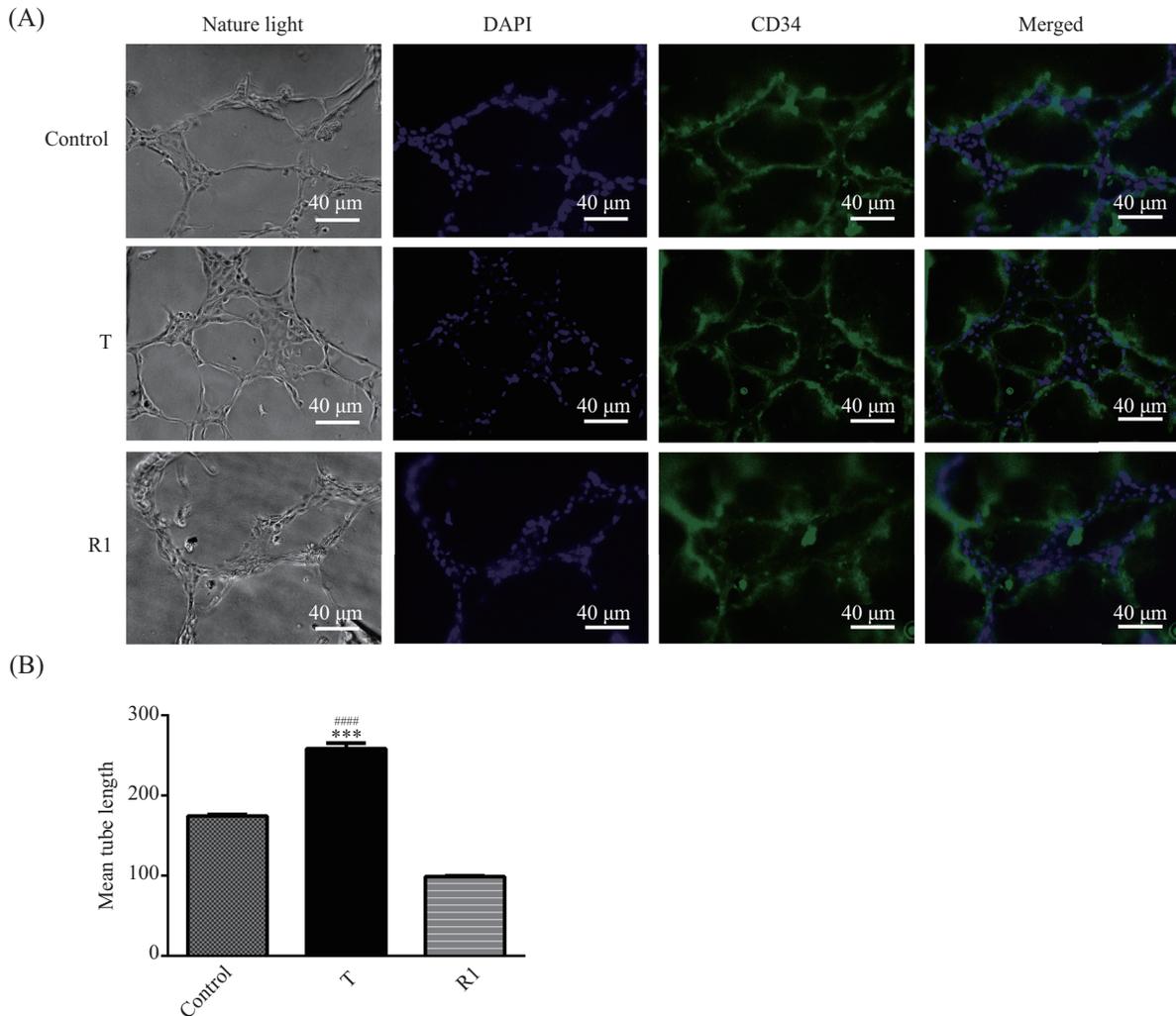
Fig.3 Activation of TGF- β 1-Smad2/3 signaling pathway and the expression of VEGFA in activated HSCs

液对HUVECs的成管作用情况, 培养6~8 h后, 行血管内皮细胞标志物CD34染色(图4A)。ImageJ分析结果提示, 对照组形成小管的平均长度为(174.4 \pm 1.9) μ m; TGF- β 1过表达组为(258.2 \pm 6.9) μ m; TGF- β 1敲低组为(98.5 \pm 1.1) μ m, TGF- β 1过表达组HSCs上清液培养的血管内皮细胞小管形成显著强于其他两组(P <0.001)(图4B)。

3 讨论

本研究结果证明了TGF- β 1激活后的HSCs具有在体外促进人脐静脉血内皮细胞血管新生的功能。正常HSCs在体内常处于静息状态, 在肝脏损伤和肝脏再生过程获得激活表型^[8], 从而变为具有肌成纤维细胞细胞表型的活化成纤维细胞(aHSCs),

且TGF- β 1起到了重要作用^[9-10]。本文中, mHSCs通过病毒转染过表达TGF- β 1后, 获得了稳定的激活表型, 并高表达其活化标志物 α -SMA^[11]。同时, 我们对TGF- β 1通过何种通路激活了mHSCs进行了探究。我们发现, 活化mHSCs较对照组而言, 能高表达TGF- β 1以及其信号通路下游的p-Smad2/3以及TGF- β 1受体TGF- β 1-RI。而在TGF- β 1敲低组中, mHSCs则未能得到活化, 并且以上指标相对与对照组的表达也明显降低。这说明, TGF- β 1通过经典的TGF- β 1-Smad2/3信号通路激活了mHSCs。在基质胶小管形成实验中, 各组以mHSCs上清液培养的HUVECs, 只有过表达TGF- β 1组的上清液培养的HUVECs形成了长度最长的小管。与这一发现一致的是, 活化mHSCs内促血管形成的关键细胞因子VEGFA的表



A: 各组细胞上清液处理后内皮细胞小管形成情况, 并行CD34免疫荧光染色鉴定新形成的血管; B: 各组新生血管长度间的比较, TGF-β1过表达组的小管形成数量明显多于其他两组(平均长度用表示 $\bar{x}\pm s$, *** $P<0.001$, 与对照组比较; #### $P<0.0001$, 与R1组比较)。

A: the tube formation of endothelial cells, after treated with cell supernatant of each group, and the newly formed vessels are determined by immunofluorescence staining of CD34; B: comparison of the length of the newly formed vessels in each group, the formation of tubes are maximum in TGF-β1 over-expressing group compared with other two groups (mean branch length shown by $\bar{x}\pm s$, *** $P<0.001$ vs control group, #### $P<0.0001$ vs R1 group).

图4 活化HSCs对血管新生的促进作用

Fig.4 The promoting effect of activated HSCs on angiogenesis

大量显著提高^[12]。这充分说明了活化后mHSCs在体外具有促血管新生作用, 其可能通过提高分泌VEGFA的量来促血管形成。

尽管有研究表明, TGF-β1对内皮细胞的凋亡有一定作用, 但细胞与基质间的相互接触作用能杜绝这种影响^[13]。而活化后的HSCs刚好又能产生大量基质^[14], 正好能杜绝这一副作用。正常肝脏中, 位于血液和肝细胞、HSCs之间的内皮细胞为肝血窦内皮细胞, 是肝细胞能与血液进行营养物质交换的重要结构^[15]。人脐静脉血内皮细胞无法还原肝脏血供在人体内的真实情况, 与肝细胞共移植的过程中能

否促进血管营养移植后的肝细胞, 保障移植肝细胞的存活率, 相关体内实验有待进一步的研究。

综上所述, 我们认为, TGF-β1通过TGF-β1-Smad2/3信号通路激活了处于静息状态下的HSCs, 且活化后的HSCs具有促进内皮细胞形成血管的作用, 为活化HSCs联合肝细胞移植后是否具有改善血管化不足的功能作出了基础性的探索。

参考文献 (References)

- 1 Nishitai R, Koch CA, Ogata K, Knudsen BE, Plummer TB, Butters KA, *et al.* Toward the survival and function of xenogeneic hepatocyte grafts. *Liver Transpl* 2005; 11(1): 39-50.

- 2 Hou YT, Ijima H, Takei T, Kawakami K. Growth factor/heparin-immobilized collagen gel system enhances viability of transplanted hepatocytes and induces angiogenesis. *J Biosci Bioeng* 2011; 112(3): 265-72.
- 3 Baranski JD, Chaturvedi RR, Stevens KR, Eyckmans J, Carvalho B, Solorzano RD, *et al*. Geometric control of vascular networks to enhance engineered tissue integration and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(19): 7586-91.
- 4 D'Alessio A, Moccia F, Li JH, Micera A, Kyriakides TR. Angiogenesis and vasculogenesis in health and disease. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 126582.
- 5 DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology* 2015; 61(5): 1740-6.
- 6 Li X, Yao QY, Liu HC, Jin QW, Xu BL, Zhang SC, *et al*. Placental growth factor silencing ameliorates liver fibrosis and angiogenesis and inhibits activation of hepatic stellate cells in a murine model of chronic liver disease. *J Cell Mol Med* 2017; 21(10): 2370-85.
- 7 Lemoine S, Cadoret A, Rautou PE, El Mourabit H, Ratzin V, Corpechot C, *et al*. Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles. *Hepatology* 2015; 61(3): 1041-55.
- 8 Brenner DA. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2009; 120: 361-8.
- 9 Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, *et al*. Transforming growth factor β signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during *in vitro* progression to myofibroblasts. *FEBS Lett* 2001; 502(1/2): 4-10.
- 10 Shah R, Reyes-Gordillo K, Arellanes-Robledo J, Lechuga CG, Hernández-Nazara Z, Cotty A, *et al*. TGF- β 1 up-regulates the Expression of PDGF- β receptor mRNA and induces a delayed PI3K-, AKT-, and p70S6K-dependent proliferative response in activated hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2013; 37(11): 1838-48.
- 11 Caliarì SR, Perepelyuk M, Soulas EM, Lee GY, Wells RG, Burdick JA. Gradually softening hydrogels for modeling hepatic stellate cell behavior during fibrosis regression. *Integr Biol (Camb)* 2016; 8(6): 720-8.
- 12 Wang CQ, Huang YW, Wang SW, Huang YL, Tsai CH, Zhao YM, *et al*. Amphiregulin enhances VEGF-A production in human chondrosarcoma cells and promotes angiogenesis by inhibiting miR-206 via FAK/c-Src/PKCdelta pathway. *Cancer Lett* 2017; 385: 261-70.
- 13 Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Vascular cell apoptosis: cell type-specific modulation by transforming growth factor-beta1 in endothelial cells versus smooth muscle cells. *Circulation* 1999; 99(15): 2019-26.
- 14 Wu K, Huang R, Wu H, Liu Y, Yang C, Cao S, *et al*. Collagen-binding vascular endothelial growth factor attenuates CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Mol Med Rep* 2016; 14(5): 4680-6.
- 15 Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, *et al*. Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases. *J Hepatol* 2017; 66(1): 212-27.