

# 人胰岛素样生长因子-1 的体外抗肝纤维化活性

万爱妮<sup>1</sup>,徐栋生<sup>2</sup>,蔡燕飞<sup>2</sup>,陈 蕴<sup>2</sup>,金 坚<sup>2</sup>,李华钟<sup>1\*</sup>

(江南大学<sup>1</sup>生物工程学院;<sup>2</sup>药学院,无锡 214122)

**摘要** 探讨人胰岛素样生长因子-1(IGF-1)的体外抗肝纤维化作用。检测 IGF-1 对人正常肝细胞 L-02 增殖及生长周期的影响;建立 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝细胞损伤模型,探究 IGF-1 抗肝细胞损伤活性;以 TGF-β1 诱导的肝星状细胞 HSC-T6 为体外纤维化研究模型,检测 IGF-1 对 HSC-T6 细胞中纤维化相关蛋白表达水平及对胞内 TGF-β1/Smad 信号通路的影响。结果显示,IGF-1 可解除 TGF-β1 对 L-02 生长的抑制作用,提高 CCl<sub>4</sub> 损伤 L-02 的细胞存活率,降低 HSC-T6 细胞纤维化相关蛋白表达水平,抑制 TGF-β1/Smad 信号通路中 Smad3 的磷酸化。结果表明,IGF-1 能够促进肝细胞增殖,保护肝细胞免受损伤,干预 TGF-β1/Smad 信号通路,抑制胞外基质 ECM 合成,从而发挥抗肝纤维化效果。

**关键词** 胰岛素样生长因子-1;转化生长因子-β1;肝细胞;肝星状细胞;肝纤维化

中图分类号 Q587 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)04-0476-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170413

**引用本文** 万爱妮,徐栋生,蔡燕飞,等. 人胰岛素样生长因子-1 的体外抗肝纤维化活性[J]. 中国药科大学学报,2017,48(4):476-482.  
**Cite this article as:** WAN Aini, XU Dongsheng, CAI Yanfei, et al. Anti-liver fibrosis activities of human insulin-like growth factor-1 *in vitro* [J]. *J. China Pharm Univ*, 2017, 48(4): 476-482.

## Anti-liver fibrosis activities of human insulin-like growth factor-1 *in vitro*

WAN Aini<sup>1</sup>, XU Dongsheng<sup>2</sup>, CAI Yanfei<sup>2</sup>, CHEN Yun<sup>2</sup>, JIN Jian<sup>2</sup>, LI Huazhong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> School of Biotechnology; <sup>2</sup> School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract** This study was focus on investigating the anti-liver fibrosis effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) *in vitro*. The effects of IGF-1 on human liver L-02 cell viability and cell cycle were observed. CCl<sub>4</sub>-induced L-02 cell injury was set up to detect the anti-apoptotic activity of insulin-like growth factor-1 (IGF-1). Transforming growth factor β1 (TGF-β1) induced hepatic stellate cell line (HSC-T6) were used as a liver fibrosis model *in vitro* to analyze the effects of IGF-1 on the expression of liver fibrosis proteins and intracellular TGF-β1/Smad signaling pathway in HSC-T6 cells. The results showed that IGF-1 could relieve the growth inhibition effects of TGF-β1 on L-02 cells, increase the viability of L-02 cells injured by CCl<sub>4</sub>, decrease the expression of liver fibrosis proteins, and inhibit the TGF-β1/Smad signaling pathway by inhibiting the phosphorylation of Smad3. Our study suggested that IGF-1 exerted anti-liver fibrosis effects by stimulating L-02 cells proliferation, reducing cell damage and inhibiting ECM accumulation via interfering TGF-β1/Smad signaling pathway.

**Key words** insulin-like growth factor-1; transforming growth factor β1; liver cells; hepatic stellate cells; liver fibrosis

This study was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA021003) and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PADA)

肝纤维化是慢性肝病发展为肝硬化的一个病理生理过程,是肝脏对多种慢性损伤因素所产生的

愈合反应<sup>[1]</sup>。致病因素(如病毒、酒精等)长期作用于肝脏,引起慢性肝损伤,并伴随肝组织炎症反

应,激活 Kupffer 细胞释放一系列细胞因子,导致肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的活化,分泌大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM),引起肝脏内弥漫性细胞外基质过度沉积,从而形成肝纤维化<sup>[2-3]</sup>。正常情况下,HSC 处于静息状态,是肝脏维生素 A 的主要来源,对内皮细胞有支撑作用。当肝脏受损后,HSC 受多种因子刺激而激活,维生素 A 减少或消失,转变为具有增殖、收缩和趋化功能的肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB),大量分泌 ECM,并引起基质金属蛋白酶(MMPs)和金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)的平衡失调,造成 ECM 沉积、纤维组织增生,逐步形成肝纤维化,最终发展成为肝硬化<sup>[4-5]</sup>。

肝星状细胞的活化是肝纤维化形成和发展的关键环节,决定了肝纤维化的发展进程<sup>[6]</sup>。转化生长因子  $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )是促进 HSC 活化及 ECM 合成的主要细胞因子,促进 HSC 细胞增殖及 ECM 产生,其中 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路是调控 ECM 表达的重要途径<sup>[7-8]</sup>。研究发现,应用 IGF-1 过表达的 BMSC 处理肝纤维化小鼠,明显减弱 HSC 的活化,上调肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)下调 TGF- $\beta 1$ ,有效改善肝功能<sup>[9]</sup>。

胰岛素样生长因子-1(IGF-1)是由 70 个氨基酸组成的碱性多肽,具有胰岛素代谢效应,对生长发育及细胞代谢有极其重要的作用。血液中 IGF-1 主要由肝脏合成和分泌,并受生长激素(growth hormone, GH)的调控<sup>[10]</sup>。IGF-1 直接与肝功能损伤程度相关,慢性肝病患者体内的 IGF-1 水平明显降低,且其降低水平与肝功能损伤程度呈正相关。肝硬化患者伴有代谢功能紊乱,如胰岛素抵抗、营养不良和骨质减少,都与 IGF-1 缺乏有关<sup>[11-12]</sup>。研究表明,CCl<sub>4</sub> 诱导的肝硬化大鼠,每日给予低剂量 IGF-1(20  $\mu$ g/kg),能明显改善肝功能,缓解肝纤维化<sup>[13-14]</sup>。因此,IGF-1 的抗纤维化治疗成为热点。本研究应用抗肝纤维化因子 IGF1,探究其体外抗肝纤维化活性并初步探索 IGF-1 体外抗肝纤维化机制。

## 1 材 料

### 1.1 试 剂

人 IGF-1 和 TGF- $\beta 1$ (美国 R&D 公司); RPMI 1640 培养基、高糖 DMEM 培养基、胎牛血清

(FBS)、胰酶(美国 Gibco 公司); TRIzol RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒(加拿大 Fermentas 公司); 引物由上海生工生物公司合成; 荧光定量染料 SYBR Green(日本 TaKaRa 公司); CellTiter-Blue 细胞活力检测系统(美国 Promega 公司); ECL 发光试剂盒、BCA 蛋白测定试剂、RAPA 裂解液和 PMSF(上海碧云天生物技术有限公司); 兔抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体、小鼠抗  $\beta$ -actin 抗体、HRP 标记山羊抗小鼠二抗、HRP 标记山羊抗兔二抗(美国 Proteintech Group 公司); 兔抗 COL1A1 抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)。其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 仪 器

蛋白质电泳及转印设备、酶标仪、流式细胞仪(美国 Bio-Rad 公司); 实时荧光定量 PCR 系统(瑞士 Roche 公司)。

### 1.3 细胞株

人正常肝细胞株 L-02(上海博古生物科技有限公司); 大鼠肝星状细胞 HSC-T6(中国科学院昆明细胞库)。

## 2 方 法

### 2.1 细胞培养

L-02 细胞用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, HSC-T6 细胞用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基,于 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,当细胞汇合度达 80% 时,用 0.25% 胰酶消化传代或接种培养板,细胞处于对数期。

### 2.2 IGF-1 和 TGF- $\beta 1$ 对 L-02 细胞增殖的影响

取对数生长期的 L-02 细胞,以每孔  $2 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板,培养 24 h,更换含 0.4% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养 12 h。分别加入不同浓度 IGF-1(0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 nmol/L), TGF- $\beta 1$ (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 nmol/L) 或不同浓度 IGF-1 + 0.4 nmol/L TGF- $\beta 1$  的 RPMI 1640,每组 4 个复孔。培养 24 h 后,每孔加 Cell Titer-Blue 试剂 10  $\mu$ L,于 37 °C 孵育 2 h,酶标仪检测荧光值( $\lambda_{\text{Ex}} = 560$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 590$ )。

### 2.3 流式细胞仪检测 IGF-1 对 L-02 细胞周期的影响

将 L-02 细胞以每孔  $2 \times 10^5$  个细胞的浓度接种

于6孔板,培养24 h。血清饥饿处理12 h后,实验分组为:20 nmol/L IGF-1+RPMI 1640、0.4 nmol/L TGF-β1+RPMI 1640、20 nmol/L IGF-1+0.4 nmol/L TGF-β1+RPMI 1640和RPMI 1640(空白对照),继续培养24 h。收集细胞,70%乙醇固定过夜。离心弃去乙醇,PBS洗2次后,用50 μg/mL RNase于37 °C孵育30 min,离心弃上清液,50 μg/mL PI于4 °C避光染色30 min。流式细胞仪检测细胞周期。

#### 2.4 IGF-1对CCl<sub>4</sub>诱导肝细胞损伤的保护作用

取对数期L-02细胞,以每孔2×10<sup>4</sup>个细胞接种于96孔板,培养24 h后,更换培养液。加入不同浓度的CCl<sub>4</sub>(0,1.25,2.5,5,10,20 mmol/L),作用2 h后,CellTiter-Blue细胞活力检测系统检测细胞活率,确定最适损伤浓度。L-02细胞以每孔2×10<sup>4</sup>个细胞的浓度接种于96孔板,实验设空白对照组,CCl<sub>4</sub>模型组(终浓度5 mmol/L),CCl<sub>4</sub>+IGF-1(2.5,5,10,20,40 nmol/L)组,每组设4个复孔。作用2 h后,每孔加CellTiter-Blue试剂10 μL,于37 °C孵育2 h,酶标仪检测荧光值。

#### 2.5 Real-Time RT-PCR检测HSC-T6细胞中α-SMA、COL I、MMP-2、TIMP-1的mRNA表达

以TGF-β1诱导的HSC-T6细胞为体外肝纤维化模型<sup>[15-16]</sup>。取对数生长期的HSC-T6细胞,以每孔2×10<sup>5</sup>个细胞的浓度接种于6孔板,培养24 h后血清饥饿处理。实验分为空白对照组(DMEM培养基)、TGF-β1组(含0.4 nmol/L TGF-β1的DMEM)、TGF-β1+IGF-1组(含0.4 nmol/L TGF-β1和20 nmol/L IGF-1的DMEM),每组设3个复孔,培养24 h后,收集细胞。根据TRIzol试剂盒说明提取总RNA,仪器中无测定RNA含量及纯度,A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>均在1.8~2.0之间。应用逆转录试剂盒将总RNA逆转录为cDNA。在GenBank查找基因序列并设计引物,引物序列如表2所示,β-actin作为内参。qPCR在荧光定量PCR仪上进行。

#### 2.6 Western blot检测HSC-T6细胞中α-SMA、COL I蛋白的表达

HSC-T6细胞按“2.5”项下方法分组,培养24 h后,用RIPA裂解液(含1 mmol/L PMSF)裂解细胞,12 000 r/min离心20 min收集上清液,BCA试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白100 μg,经10% SDS-PAGE分离后电转移至硝酸纤维素膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭2 h,分别加入抗-α-SMA、

抗-COL1A1、抗-β-actin一抗,4 °C孵育过夜。TBST缓冲液清洗3次后,分别加入对应的HRP标记的二抗,室温孵育2 h。同样清洗3次,ECL化学发光法显色并分析结果。

#### 2.7 Western blot检测HSC-T6细胞中Smad3的蛋白表达

HSC-T6细胞按“2.5”项下方法分组,孵育30 min后,按“2.6”项下方法裂解细胞,收集蛋白。经10%SDS-PAGE分离后,电转至NC膜,5%脱脂牛奶室温封闭2 h,分别加入抗-p-Smad3、抗-Smad3、抗-β-actin一抗,4 °C孵育过夜。加入相应HRP标记二抗,ECL化学发光显色。

#### 2.8 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异采用t检验。

### 3 结果

#### 3.1 IGF-1降低TGF-β1对L-02细胞增殖的抑制作用

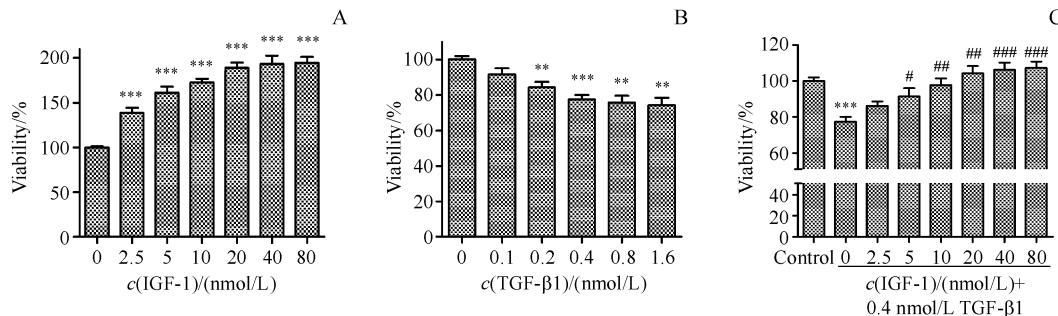
IGF-1和TGF-β1对L-02细胞生长有不同的影响。IGF-1在一定浓度范围内明显促进L-02细胞增殖(图1-A),最高增殖率达到(194.68 ± 13.1)%,而TGF-β1一定浓度范围内明显抑制L-02细胞生长(图1-B),以0.4 nmol/L时抑制作用最为明显。选用0.4 nmol/L TGF-β1作为作用浓度,加入不同浓度的IGF-1,作用24 h后,结果显示,IGF-1明显解除TGF-β1对L-02增殖的抑制作用,且在0~20 nmol/L浓度范围内呈剂量依赖关系(图1-C),当浓度达到20 nmol/L,IGF-1的作用趋于饱和。

#### 3.2 IGF-1和TGF-β1对L-02细胞周期的影响

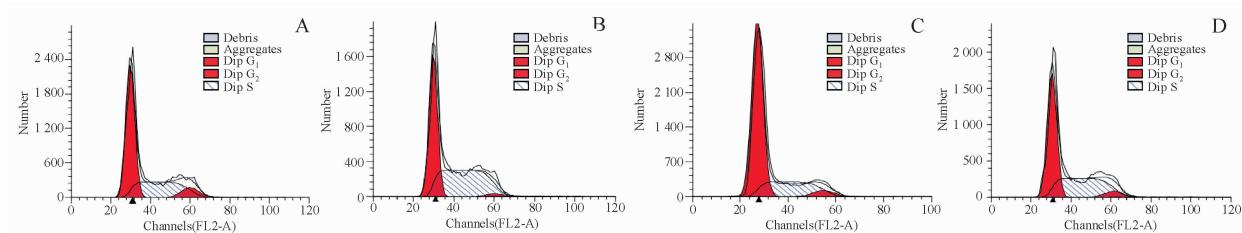
IGF-1和TGF-β1对L-02细胞周期同样具有不同的影响。结果显示,IGF-1处理L-02细胞(图2-B)后,与空白对照组(图2-A)相比,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞百分率明显减少,增殖指数[PI = (S + G<sub>2</sub>/M)/(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> + S + G<sub>2</sub>/M)]由(42.78 ± 1.92)%增加至(53.56 ± 2.34)% (表1),表明IGF-1能明显促进L-02细胞周期进展。TGF-β1作用L-02细胞(图2-C)后,对细胞周期具有明显的阻滞作用。与空白对照组相比,TGF-β1处理组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞百分率增加,增殖指数由(42.78 ± 1.92)%降低为(30.95 ± 3.24)%。IGF-1能明显降低TGF-β1对

L-02细胞周期的阻滞作用,与TGF- $\beta$ 1处理组相比,IGF-1+TGF- $\beta$ 1处理组(图2-D)G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细

胞百分率明显降低,增殖指数由(30.95±3.24)%增加至(46.51±4.11)% (表1)。



**Figure 1** Effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) or/and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) on L-02 cells proliferation ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )  
A: Proliferative activity of IGF-1 on L-02 cells; B: Growth inhibitory activity of TGF- $\beta$ 1 on L-02 cells; C: Inhibition effect of IGF-1 on TGF- $\beta$ 1 induced L-02 cell apoptosis. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs 0.4 nmol/L TGF- $\beta$ 1 group



**Figure 2** Cell cycle analysis of L-02 cells

A: Control; B: 20 nmol/L IGF-1; C: 0.4 nmol/L TGF- $\beta$ 1; D: 20 nmol/L IGF-1 + 0.4 nmol/L TGF- $\beta$ 1

**Table 1** Effects of IGF-1 and TGF- $\beta$ 1 on cell cycle progression of L-02 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Group	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> /%	S/%	G <sub>2</sub> /M/%	PI/%
Control	57.22±1.92	35.45±1.42	7.34±1.30	42.78±1.92
IGF-1	46.44±2.34**	47.90±3.93**	5.67±3.00	53.56±2.34**
TGF- $\beta$ 1	69.05±3.24**	25.07±2.79**	5.89±1.04	30.95±3.24**
IGF-1+TGF- $\beta$ 1	53.49±4.11##	41.56±2.04##	4.95±2.07	46.51±4.11##

\* \*  $P < 0.01$  vs control group; ##  $P < 0.01$  vs TGF- $\beta$ 1 group

### 3.3 IGF-1 对 CCl<sub>4</sub> 诱导肝损伤模型的保护作用

不同浓度的CCl<sub>4</sub>处理L-02细胞后,与空白对照组相比,L-02细胞的存活率随CCl<sub>4</sub>浓度增大而降低,且呈剂量依赖关系(图3-A)。为避免细胞的不可逆损伤、更好地显示IGF-1对肝细胞损伤的作用,本研究选用5 mmol/L CCl<sub>4</sub>作为制备肝细胞损伤模型浓度。结果显示,IGF-1明显提高CCl<sub>4</sub>损伤的L-02细胞活率,且随IGF-1浓度提高,保护作用逐渐增强(图3-B)。

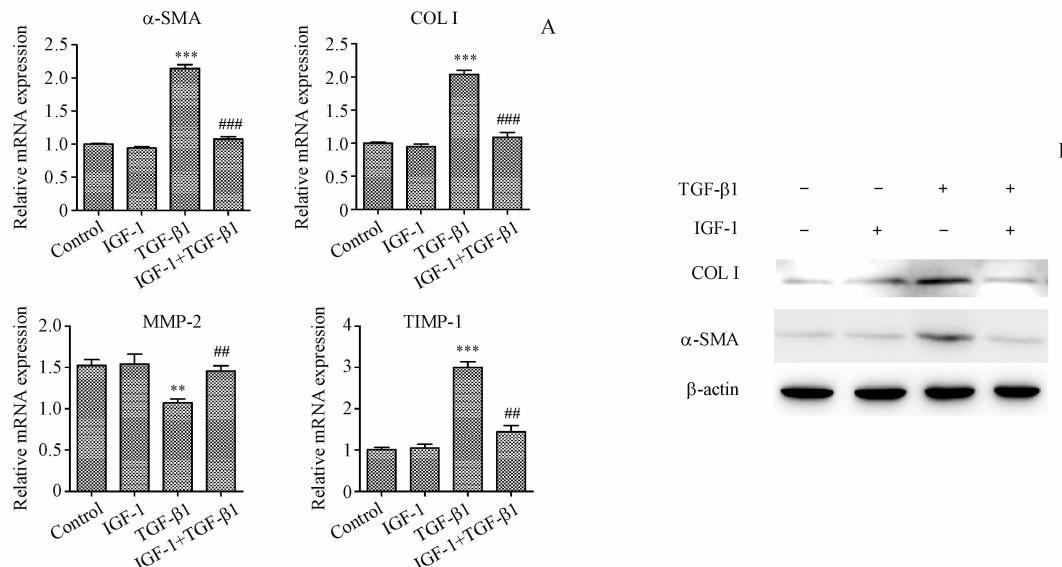
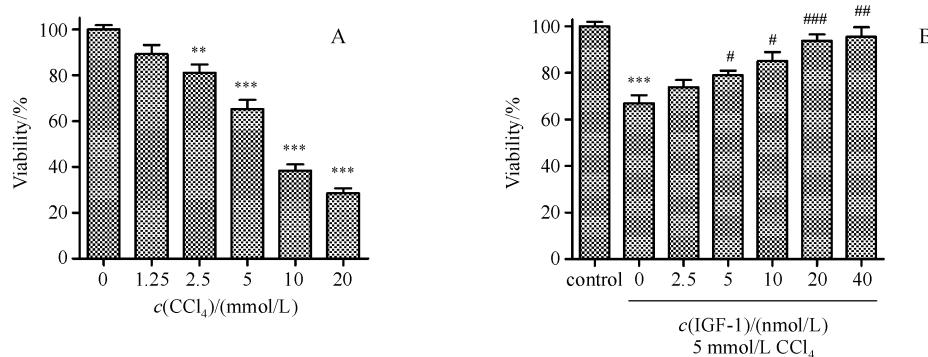
### 3.4 IGF-1 对 HSC-T6 细胞活化标志物的影响

TGF- $\beta$ 1处理HSC-T6细胞24 h后,与对照组相比,HSC-T6细胞活化标志物 $\alpha$ -SMA、COL I、TIMP-1的mRNA水平明显提高,MMP-2的mRNA水平明显升高(图4-A)。Western blot的结果显示,TGF- $\beta$ 1处理HSC-T6细胞后,细胞内的 $\alpha$ -SMA、COL I的蛋白表达水平明显升高。而IGF-1可以明显抑制TGF- $\beta$ 1诱导的 $\alpha$ -SMA、COL I的蛋白表达水平(图4-B)。

水平明显降低。而IGF-1处理组与TGF- $\beta$ 1处理组相比, $\alpha$ -SMA、COL I、TIMP-1的mRNA水平明显降低,MMP-2的mRNA水平明显升高(图4-A)。Western blot的结果显示,TGF- $\beta$ 1处理HSC-T6细胞后,细胞内的 $\alpha$ -SMA、COL I的蛋白表达水平明显升高。而IGF-1可以明显抑制TGF- $\beta$ 1诱导的 $\alpha$ -SMA、COL I的蛋白表达水平(图4-B)。

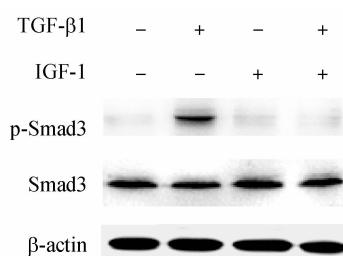
**Table 2** Primer sequences for real-time RT-PCR

Gene	Forward primer 5'→3'	Reverse primer 5'→3'
$\alpha$ -SMA	tgggacgacatggaaaagatctggc	atacatcgaggacatctggc
COL I	tgcacatcaaggctactgcacat	ggatccatcggtatcgctctcc
MMP-2	cctgagtcggaaaagatgtat	caggctggcgtggctgggttgggtt
TIMP-1	tcatcgagaccatataccagcg	tggaaaactctcgatcggttctcg



### 3.5 IGF-1 对 HSC-T6 细胞中 TGF-β1/Smad 信号通路的影响

为探究 IGF-1 对 TGF-β1 信号传导的作用, 应用 Western blot 检测 IGF-1 对 TGF-β1 信号通路下游 Smad3 磷酸化的影响。结果显示, TGF-β1 刺激 HSC-T6 细胞内 Smad3 的磷酸化, 而 IGF-1 处理 HSC-T6 细胞后, 与 TGF-β1 处理组比较, Smad3 的磷酸化程度降低, 恢复正常水平(图 5), 说明 IGF-1 能抑制 TGF-β1/Smad 信号通路, 调控 TGF-β1 引起的一系列生物学功能。



**Figure 5** Effects of IGF-1 on phosphorylation of Smad3 in HSC-T6 cells induced by TGF- $\beta$ 1

## 4 讨 论

肝纤维化是一个非常复杂的病理过程,主要是慢性肝损伤因素导致肝细胞变性坏死及炎症反应,表现为肝细胞外基质过度沉积,纤维组织增生,严重威胁人类健康<sup>[17]</sup>。随着对肝纤维化的广泛深入研究,很多研究证实肝纤维化处于动态平衡,在一定程度上可逆<sup>[18]</sup>。因此,积极预防、阻断甚至逆转肝纤维化是治疗慢性肝脏疾病的重要环节<sup>[19]</sup>。

L-02 细胞是人正常肝细胞株,相对于其他细胞株,更接近人体正常肝细胞生活状态,是一种理想的肝细胞损伤的材料。CCl<sub>4</sub> 具有强烈肝毒性,通过脂质过氧化反应引起急、慢性肝损伤,CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝损伤是一种经典的实验肝损伤模型<sup>[20-22]</sup>。CCl<sub>4</sub> 经肝微粒体内的混合功能酶而激活,产生三氯甲基游离基(CCl<sub>3</sub>·)和羟自由基(OH·)等。这些自由基可攻击肝细胞膜上的磷脂分子,引起脂质过氧化反应,损伤肝细胞膜结构,导致肝细胞变性、坏死<sup>[23-25]</sup>。本研究表明,IGF-1 对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝损伤模型有明显的保护作用,且呈剂量依赖关系。IGF-1 的肝细胞保护作用可能与 IGF-1 的抗氧化活性相关,通过清除自由基,修复抗氧化酶系统,从而减轻肝细胞的氧化损伤,稳定细胞膜结构<sup>[26]</sup>。

HSC 的活化及 ECM 的沉积是肝纤维化形成的关键环节。肝纤维化发生过程中,多种细胞因子通过自分泌或旁分泌的形式作用于 HSC,调控 HSC 的激活、增殖、凋亡及 ECM 分泌<sup>[27]</sup>。TGF-β1 是目前已知最强的促肝纤维化因子,具有促进肝细胞凋亡、激活 HSC 并促使其产生大量 ECM 的作用<sup>[28]</sup>。TGF-β1/Smad 信号通路是调节 ECM 的基因表达的重要途径。TGF-β1 与Ⅱ型受体(TβRⅡ)结合后,募集并结合Ⅰ型受体(TβRⅠ),激活的 TβRⅠ 磷酸化 R-Smads(Smad2 和 Smad3),随后与 Co-Smad(Smad4)结合,将信号转导至细胞核,通过调控靶基因转录,发挥生物学效应<sup>[29-30]</sup>。Smad3 是最关键的因子,直接介导 HSC 的基质产生及基质相互作用,提高 Collagen 的表达<sup>[31]</sup>。本研究发现 IGF-1 对 TGF-β1 诱导的 Smad3 的磷酸化有明显的抑制作用,进而影响 TGF-β1 诱导的一系列反应,阻断肝纤维化进程。综上所述,IGF-1 具有促进肝细胞增殖与保护肝损伤细胞的作用,通过影响

纤维化过程中的以下环节:抑制 TGF-β1/Smad 信号传导,抑制胞外基质的分泌,促进胞外基质的降解,胞外基质的合成和降解处于动态平衡,最终达到缓解肝纤维化的作用。

## 参 考 文 献

- Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6(1): 425-456.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(2): 209-218.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(4): 2247-2250.
- Brandao DF, Ramalho LN, Ramalho FS, et al. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells [J]. *Acta Cir Bras*, 2006, 21(Suppl 1): 54-57.
- Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25(2): 195-206.
- Wells RG. Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis [J]. *Clin Liver Dis*, 2008, 12(4): 759-768.
- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets [J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1): 76-99.
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, et al. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis [J]. *Front Biosci*, 2002, 7(1/2/3): d793-d807.
- Foo NP, Lin SH, Lee YH, et al. Alpha-lipoic acid inhibits liver fibrosis through the attenuation of ROS-triggered signaling in hepatic stellate cells activated by PDGF and TGF-beta [J]. *Toxicol*, 2011, 282(1/2): 39-46.
- Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone [J]. *Mol Pathol*, 2001, 54(5): 311-316.
- Karen B, Søren M. Insulin-like growth factor-I and the liver [J]. *Liver Int*, 2011, 31(7): 911-919.
- Blomsma MC, deKnegt RJ, Dullaart RP, et al. Insulin-like growth factor-1 in liver cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 1997, 27(6): 1133-1138.
- Castilla-Cortazar I, Garcia M, Muguerza B, et al. Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis [J]. *Gastroenterol*, 1997, 113(5): 1682-1691.
- Muguerza B, Castilla-Cortazar I, Garcia M, et al. Antifibrogenic effect *in vivo* of low doses of insulin-like growth factor-I in cirrhotic rats [J]. *Acta Biochim Biophys*, 2001, 1536(2/3): 185-195.
- Chen XX, Xie J, Chen H, et al. EZH2 plays a role in HSC-T6 cell proliferation and activation affecting MAPK/ERK and PI3 K/AKT pathway [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2015,

- 31(8):1061-1065.
- [16] Xu T, Ni MM, Li X, et al. NLRC5 regulates TGF- $\beta$ 1-induced proliferation and activation of hepatic stellate cells during hepatic fibrosis [J]. *Inter J Biochem Cell B*, 2016, 70:92-104.
- [17] Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside [J]. *J Hepatol*, 2003, 38(Suppl 1):S38-S53.
- [18] Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis [J]. *Front Biosci*, 2002, 7(1-3):d808-d826.
- [19] Watanabe T, Niioka M, Hozawa S, et al. Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride [J]. *J Hepatol*, 2000, 33(2):224-235.
- [20] Wang L, Potter JJ, Rennie-Tankersley L, et al. Effects of retinoic acid on the development of liver fibrosis produced by carbon tetrachloride in mice [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(1):66-71.
- [21] Yin G, Ping L, Xu P. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Glycyrrhiza glabra* extract against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2011, 37(1):209-216.
- [22] Liu SQ, Yu JP, Ran ZX. Experimental study on *Ginkgo Biloba* extract against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage in rats [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2003, 34(1):61-64.
- [23] Zhong LF, Zhang JG, Zhang FQ, et al. Mechanisms of carbon tetrachloride-induced liver injury in rats [J]. *Chin J Pharm Toxicol* (中国药理学与毒理学), 1989, 3(4):298-303.
- [24] Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA, et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity [J]. *Pharmacol Ther*, 1989, 43(1):139-154.
- [25] Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients [J]. *Toxicol*, 2003, 189(1/2):113-127.
- [26] CastillaCortazar I, Garcia M, Muguerza B, et al. Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis [J]. *Gastroenterology*, 1997, 113(5):1682-1691.
- [27] Nakamura I, Zakharia K, Banini BA, et al. Brivanib attenuates hepatic fibrosis *in vivo* and stellate cell activation *in vitro* by inhibition of FGF, VEGF and PDGF signaling [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(4):e92273.
- [28] Sprenger H, Kaufmann A, Garn H, et al. Induction of neutrophil-attracting chemokines in transforming rat hepatic stellate cells [J]. *Gastroenterol*, 1997, 113(1):277-285.
- [29] Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis *in vivo* and hepatic stellate cell line *in vitro* [J]. *Pathol Int*, 2003, 53(1):18-26.
- [30] Zheng Y, Zhao C, Wang F, et al. Effects and mechanisms of stilbene glucoside on the proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts stimulated by TGF- $\beta$ 1 [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2014, 45(3):362-367.
- [31] Uemura M, Swenson ES, Gaça MD, et al. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and Smooth muscle actin organization [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 16(9):4214-4224.