DOI:10.16016/j.2097-0927.202308057

沉默 CTGF 对肝星状细胞凋亡及胞外基质表达的影响

蔡秀华[1],董岸莺[2],张荣华[1],柏千苹[1],蒋 毅[1],陈雪猛[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院中医与风湿免疫科[1];841000 新疆 库尔勒,解放军 951 医院心肾呼吸科[2]

[摘要] **目的** 观测沉默结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)基因对肝星状细胞 T6(hepatic stellate cell T6,HSC_T6)的生长与凋亡,以及增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)、CTGF、整合素 α5(integrin alpha 5,Itgα5)和Ⅰ型胶原(collagen Ⅰ, Col Ⅰ)表达的影响。**方法** 将 CTGF-shRNA 病毒感染 HSC_T6(实验组)。空病毒感染的 HSC_T6(空病毒组)或未感染的 HSC_T6(正常组)作对照。在显微镜下观测被感染 HSC_T6 的生长与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的表达变化;采用 CCK-8(cell count kit-8))比色检测被感染 HSC_T6 的增殖情况;流式细胞仪(flow cytometry,FCM)检测被感染 HSC_T6 的凋亡情况。定量 PCR、Western blot 及免疫荧光细胞化学分别检测 PCNA、CTGF、Itgα5 和 Col Ⅰ的表达变化。**结果** 在显微镜下观察到被感染的 HSC_T6 高表达 GFP。CCK-8 结果表明,与对照相比,沉默 CTGF 基因的 HSC_T6 生长显著受抑,72 h 开始其差异具统计学意义($P<0.05$)。FCM 检测结果显示,沉默 CTGF 基因可诱导 HSC_T6 凋亡。定量 PCR、Western blot 及免疫荧光细胞化学结果证实,沉默 CTGF 基因可在 mRNA 及蛋白水平明显下调 HSC_T6 的 PCNA、CTGF、Itgα5 与 Col Ⅰ的表达,与对照比较,差异均具统计学意义($P<0.05$)。**结论** 沉默 CTGF 基因可下调 HSC_T6 的 PCNA、CTGF、Itgα5 及 Col Ⅰ的表达,抑制 HSC_T6 的生长,诱导 HSC_T6 凋亡,其机制可能和 HSC_T6 的 CTGF/Itgα5 信号通路受阻紧密相关。

[关键词] 结缔组织生长因子;肝星状细胞 T6;整合素 α5;Ⅰ型胶原;细胞凋亡
[中图法分类号] R322.47; R341; R394.3 [文献标志码] A

Effects of silencing CTGF on apoptosis and expression of extracelluar matrix proteins in rat hepatic stellate T6 cells

CAI Xiuhua[1], DONG Anying[2], ZHANG Ronghua[1], BAI Ganping[1], JIANG Yi[1], CHEN Xuemeng[1] [1]Department of Traditional Chinese Medicine and Rheumatology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Heart, Kidney and Respiration, No. 951 Hospital of PLA, Korla, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 841000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of silencing connective tissue growth factor (CTGF) gene on growth, apoptosis, and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), CTGF, integrin alpha 5 (Itgα5) and collagen Ⅰ (Col Ⅰ) in rat hepatic stellate cell line T6 (HSC_T6). **Methods** The CTGF shRNA lentiviral vectors with high infectivity were transfected into HSC_T6 cells, and the cells transfected with empty virus or not transfected served as control cells. Fluorescence inverted microscopy was used to observe the cell growth and the expression of green fluorescent protein (GFP) in the transfected HSC_T6 cells. CCK-8 assay and flow cytometry were employed respectively to detect the cell viability and apoptosis. The expression changes in PCNA, CTGF, Itgα5 and Col Ⅰ were measured by real-time PCR, Western blotting and immunofluorescence assay. **Results** Microscopic observation displayed that transfection with CTGF shRNA lentiviral vectors resulted in high expression of GFP in HSC_T6 cells. CCK-8 assay showed

[基金项目] 军事医学科技创新计划重点项目(SWH2017JCZD-5)
[通信作者] 张荣华,E-mail:zhrhlggg@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

that silencing CTGF induced inhibited growth in the transfected cells, with significant difference since 72 h after transfection ($P<0.05$). Flow cytometry indicated that transfection of CTGF shRNA lentivirus led to the apoptosis of HSC_T6 cells. The results of real-time PCR, Western blotting and immunofluorescence assay confirmed that CTGF shRNA lentivirus effectively down-regulated the expression of PCNA, CTGF, Itgα5 and Col Ⅰ, with notable differences when compared the expression in control cells ($P<0.05$). **Conclusion** Silencing CTGF can down-regulate the expression of CTGF, Itgα5 and Col Ⅰ, inhibit the growth and induce the apoptosis of HSC_T6 cells, which might be closely associated with its interference for the CTGF/Itgα5 signaling pathway.

[**Key words**] connective tissue growth factor; hepatic stellate cells; integrin alpha 5; collagen Ⅰ; apoptosis

Supported by the Key Project of Military Medical Science and Technology Innovation Program (SWH2017JCZD-5). Corresponding author: ZHANG Ronghua, E-mail: zhrhlggg@163.com

结缔组织在肝内异常持续增生将形成肝纤维化(hepatic fibrosis,HF)。在肝硬化与肝癌的病变过程中,HF 是不可或缺的病理基础。活化、增殖的肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)是 HF 发生与发展的中心环节[1]。HSC 可过度合成与分泌多种细胞外基质(extracellular matrix,ECM),促使 HF 的形成,其中Ⅰ型胶原(collagen Ⅰ, Col Ⅰ)对 HF 的形成发挥着重要作用[2]。

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)是一种基质细胞蛋白,可通过各种整合素亚型受体介导细胞-基质相互作用,是组织重塑和纤维化发展的关键环节[3]。整合素 α5(integrin alpha 5,Itgα5)是整合素亚型受体中的重要一员,是多器官纤维化的中心介质[4]。多器官纤维化发展过程中,CTGF 与 Itgα5 间存在相互调控作用[3-5]。多种纤维化组织中,CTGF、Itgα5 表达升高,在 HF 组织中,CTGF、Itgα5 的表达升高更为明显[3]。多种因子,尤其 CTGF 对 HF 的发生与发展起到了重要的调控作用[6-8],因此,该调控是否与 CTGF/Itgα5 信号通路相关,尚需研究证实。

为进一步探讨 CTGF/Itgα5 信号通路与 HF 的相关性,本研究利用前期构建的携带 CTGF 基因的 CTGF-shRNA 病毒[9],感染肝星状细胞 T6(hepatic stellate cell T6,HSC_T6),观察干扰 CTGF 表达后,HSC_T6 的生长与凋亡情况,以及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)、CTGF、Itgα5 和 Col Ⅰ的表达变化,以期揭示 CTGF 在 HF 的作用和可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HSC_T6 株购于中国科学院昆明细胞库。定量 PCR 试剂盒购于中国大连宝生物公司;CTGF、Itgα5、PCNA 与 Col Ⅰ抗体购于美国 Abcam 公司;胎牛血清购于美国 Sigma 公司;引物合成于中国上海捷瑞公司;DMEM 培养基购于美国 HyClone 公司;PVDF 膜购于美国 Bio-Rad 公司;Annexin V-PI 细胞凋亡检测试剂盒购于日本 Dojindo 公司;基因转染试剂 Lipofectamine© 2000 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 HSC_T6 的病毒感染、分组及其生长观测

HSC_T6 的 CTGF-shRNA 病毒感染、感染后 HSC_T6 的生长观察与感染后 HSC_T6 的 PCNA 表达检测均参照前期实验[9-10]进行。携带 CTGF-shRNA 的 pCDH 慢病毒载体含 EF1 和 CMV7 启动子,分别驱动绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)与 shRNA 的表达。以 CTGF-shRNA 病毒感染的 HSC_T6 为实验组,空病毒感染和未感染的 HSC_T6 分别为空病毒组和正常组。

1.2.2 过表达 CTGF-shRNA 的 HSC_T6 增殖情况检测

分别收集经 CTGF-shRNA 病毒感染 72 h 的各组 HSC_T6,制成单细胞悬液,接种于 96 孔板(3×10^3 个/孔),每组 HSC_T6 设置 4 个复孔。继续培养 24、48、72、96 h,分别添加 CCK-8 试剂(10 μL/孔),混匀,继续培养 3.5 h 后,分别检测 450 nm 波长处各孔细胞的光密度值[$D(450)$],以 $D(450)$ 为 Y 轴,培养时间为 X 轴,分别绘制各组 HSC_T6 的增殖曲线。

1.2.3 过表达 CTGF-shRNA 的 HSC_T6 凋亡检测

参照前期实验[11]测试 CTGF-shRNA 慢病毒对 HSC_T6 凋亡的影响,具体如下。加病毒液 72 h 后,分别收集各组 HSC_T6 悬液 100 μL(5 万~10 万个细胞),添加 196 μL 的缓冲液及 5 μL Annexin V-FITC 液,混匀,室温,避光孵育约 13 min,离心约 7 min(1 000 ×g)。各组 HSC_T6 添加 196 μL 的缓冲液与 PI 液 11 μL 混匀。流式细胞仪(flow cytometry, FCM)分析,测试各组 HSC_T6 凋亡情况。

1.2.4 过表达 CTGF-shRNA 的 HSC_T6 中相关基因 mRNA 表达的定量 PCR 检测

分别设计 CTGF、Itgα5 与 Col Ⅰ基因的定量 PCR 检测引物(表 1),并予以合成。以各组 HSC_T6 总 RNA 为模板,定量 PCR

分别检测各组 HSC_T6 的 CTGF、Itgα5 和 Col Ⅰ的 mRNA 表达变化,GAPDH 为内参照。以 2 的-△△Ct 次方($2^{-\triangle\triangle Ct}$)计算目的基因 mRNA 的相对表达水平,在计算过程中将正常组数据进行归 1,其他各组与其相比后,绘制统计图。

表 1 定量 PCR 检测各基因的引物、Tm 值及产物

基因	序列(3'→5')	Tm/℃	产物大小/bp
CTGF	上游:GGCGAATGAAACTCCCAGTC	56.02	200
	下游:GCAGCCAGAAAGCTCAAACT	56.12	
Itgα5	上游:TGGACCAAGACGGCTACAAT	56.03	
	下游:GGCAGAGCCAAAGAAGTCTG	55.93	173
Col Ⅰ	上游:CCCTGCTGGAGAAGAAGGAA	56.01	187
	下游:AGGAGAACCTTTGGGACCAG	55.91	
GAPDH	上游:TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG	59.01	111
	下游:AGGTGGAAGAATGGGAGTTG	58.99	

1.2.5 过表达 CTGF-shRNA 的 HSC_T6 中相关蛋白表达的 Westem blot 检测 采用 Western blot 将各组 HSC_T6 总蛋白转至 PVDF 膜上,分别浸于 CTGF(1∶700)、Itgα5(1∶600)及 Col Ⅰ一抗(1∶650)封闭液中,5 ℃,孵育 24 h 后,分别与相应二抗室温孵育约 3 h,再和化学发光底物结合约 13 min,GAPDH 为内参照。采用图像分析软件(Image-Pro Plus, Media Cybernetics Inc, USA)对各组 Western blot 条带进行光密度值分析,以此计算蛋白的相对表达水平,在计算过程中,将目标条带及相应内参的平均光密度值分别进行比值计算,以正常组数据为基准 1,对各组数据作归一化换算。

1.2.6 过表达 CTGF-shRNA 的 HSC_T6 中 CTGF、Itgα5、Col Ⅰ表达的免疫荧光细胞化学检测 用含适量病毒液的完全培养基爬片培养 HSC_T6(实验组)48~72 h,收集、固定和抗原修复 HSC_T6,分别于 4 ℃与 CTGF(1∶350)、Itgα5(1∶500)及 Col Ⅰ一抗(1∶450)过夜孵育,再分别同荧光标记的相应二抗,37 ℃孵育约 35 min。PBS 洗涤,封片,荧光显微镜分别观察和拍照 CTGF、Itgα5 及 Col Ⅰ蛋白的表达变化。空病毒组及正常组 HSC_T6 的处理方法与实验组相同。采用 Image-Pro Plus 软件对各组 HSC_T6 的荧光蛋白进行灰度级分析,分别计算 CTGF、Itgα5 及 Col Ⅰ免疫荧光蛋白的相对表达水平。

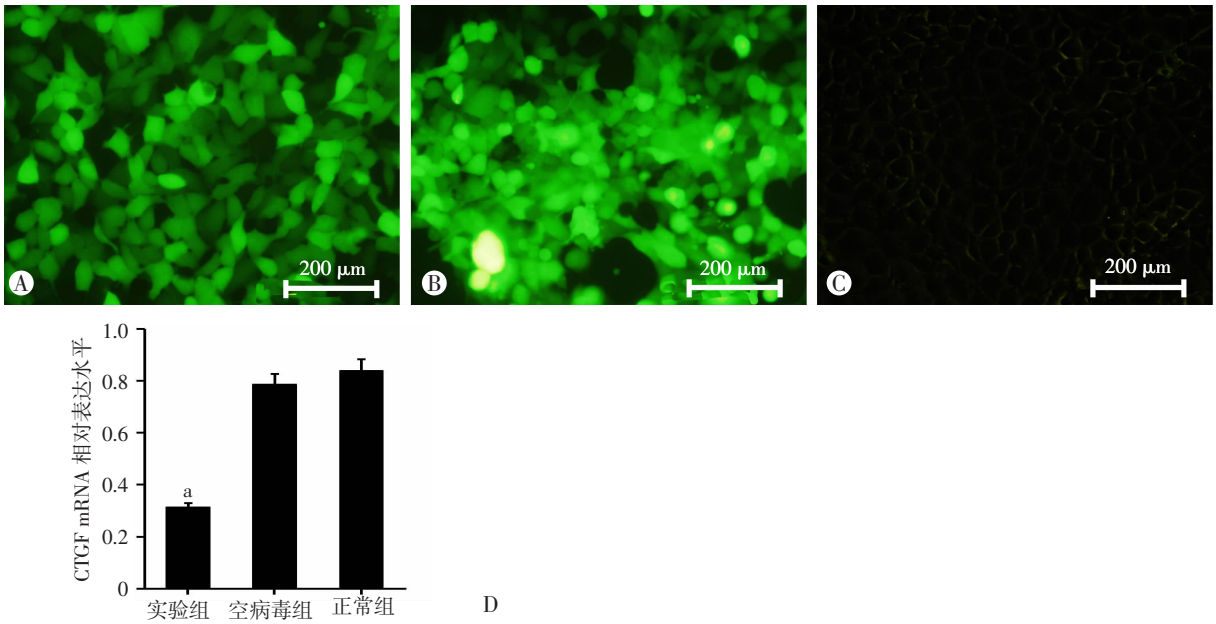
1.3 统计学分析

数据用 SPSS 22.0 统计学软件进行独立样本 t 检验,以确定组间差异,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

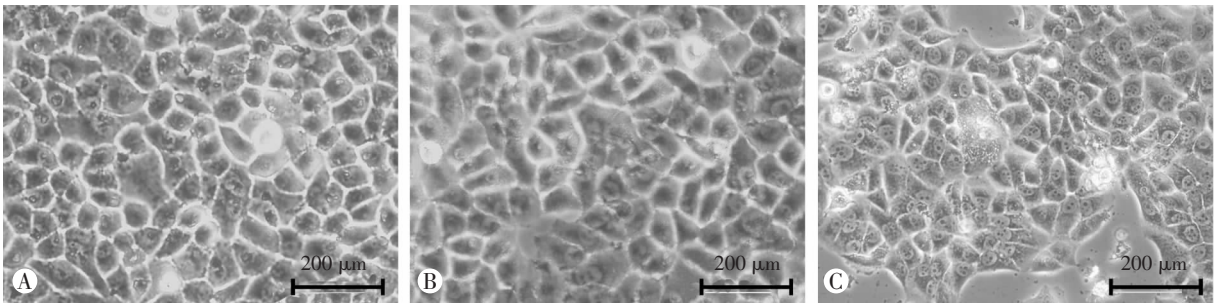
2.1 感染 CTGF-shRNA 病毒的 HSC_T6 高表达 GFP

荧光显微镜观测可见,经 CTGF-shRNA 病毒感染(图 1A)和空病毒感染(图 1B)的 HSC_T6,高表达 GFP,未感染 CTGF-shRNA 病毒的 HSC_T6(图 1C)不表达 GFP,其感染率达 90%以上。定量 PCR 检测显示,被感染的 HSC_T6 与感染前比较,其 CTGF 的表达明显下调,差异有统计学意义($P<0.05$,图 1D)。



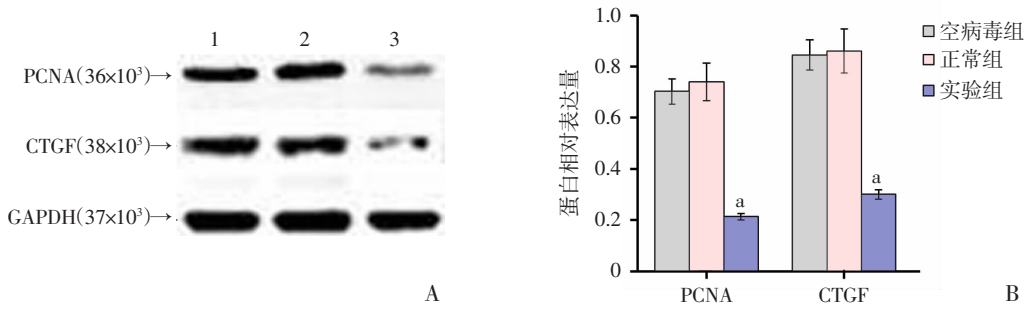
A:CTGF-shRNA 病毒感染的 HSC_T6; B:空病毒感染的 HSC_T6; C:正常 HSC_T6; D:CTGF mRNA 的定量分析 a:$P<0.05$,与正常组或空病毒组比较

图 1 HSC_T6 的 CTGF-shRNA 病毒感染观察及其感染后 CTGF mRNA 表达水平的定量 PCR 检测



A:空病毒感染的 HSC_T6; B:正常 HSC_T6; C:CTGF-shRNA 病毒感染的 HSC_T6

图 2 HSC_T6 感染 CTGF-shRNA 病毒后的形态观察



A:Western blot 检测 PCNA、CTGF 蛋白表达 1:空病毒组;2:正常组;3:实验组;B:PCNA、CTGF 蛋白表达的定量分析 a:$P<0.05$,与正常组或空病毒组比较

图 3 Western blot 检测 HSC_T6 感染 CTGF-shRNA 病毒后的 PCNA、CTGF 蛋白表达

2.2 HSC_T6 过表达 CTGF-shRNA 下调其 PCNA 的表达并抑制其生长

镜下可见,与空病毒感染(图 2A)或未感染组(图 2B)的 HSC_T6 相比,过表达 CTGF-shRNA 48~72 h 的 HSC_T6,其胞体稍变圆、变小,表面见粗糙感(图 2C)。Western blot 检测(图 3A)显示,过表达 CTGF-shRNA 能显著下调 HSC_T6 的 PCNA 与 CTGF 的表达,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 3B)。结果提示,CTGF-shRNA 病毒可影响 HSC_T6 的形态和 PCNA 的表达。

2.3 HSC_T6 过表达 CTGF-shRNA 抑制其增殖

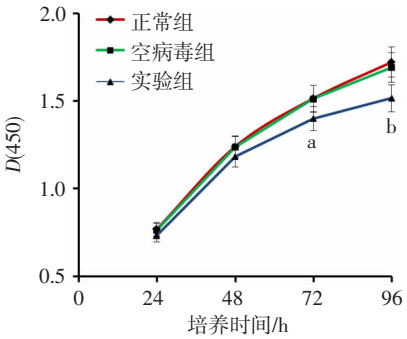
CCK-8 检测结果显示,HSC_T6 过表达 CTGF-shRNA,其增殖慢于空病毒感染或未感染的 HSC_T6,72 h 开始差异更为明显($P<0.05$,图 4)。

2.4 HSC_T6 过表达 CTGF-shRNA 促进其凋亡率明显增高

FCM 检测证实,与空病毒感染组或正常组 HSC_T6 比较,过表达 CTGF-shRNA 的 HSC_T6,其凋亡率[(28.89±2.19)%]明显增加(图 5),差异有统计学意义($P<0.01$)。结果提示,过表达 CTGF-shRNA 可诱导 HSC_T6 凋亡。

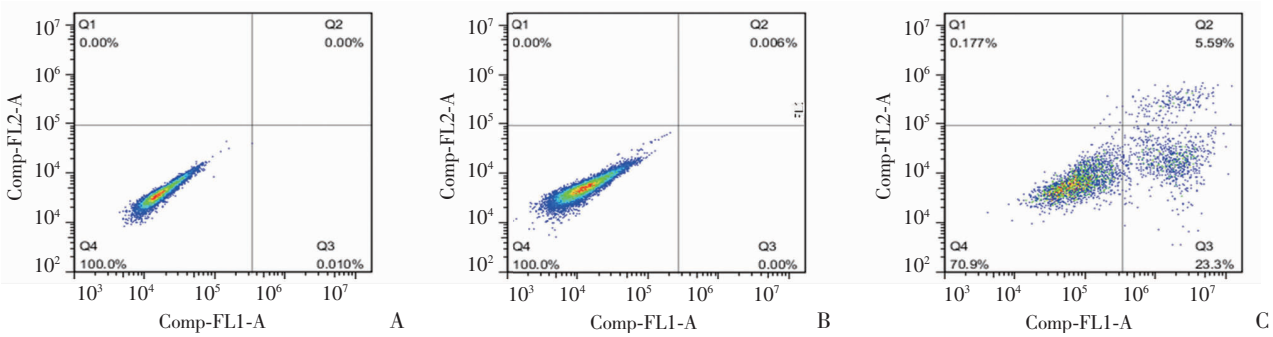
2.5 HSC_T6 过表达 CTGF-shRNA 下调其 CTGF、Itgα5 与 Col Ⅰ的表达

定量 PCR(图 6)、Western blot(图 7)及免疫荧光细胞化学(图 8)检测显示,过表达 CTGF-shRNA 能有效下调 HSC_T6 的 CTGF、Itgα5 与 Col Ⅰ表达,差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果提示,干扰 HSC_T6 的 CTGF 表达,调节其 CTGF/Itgα5 信号通路及下调其 Col Ⅰ可能是 HSC_T6 生长受抑的重要机制之一。



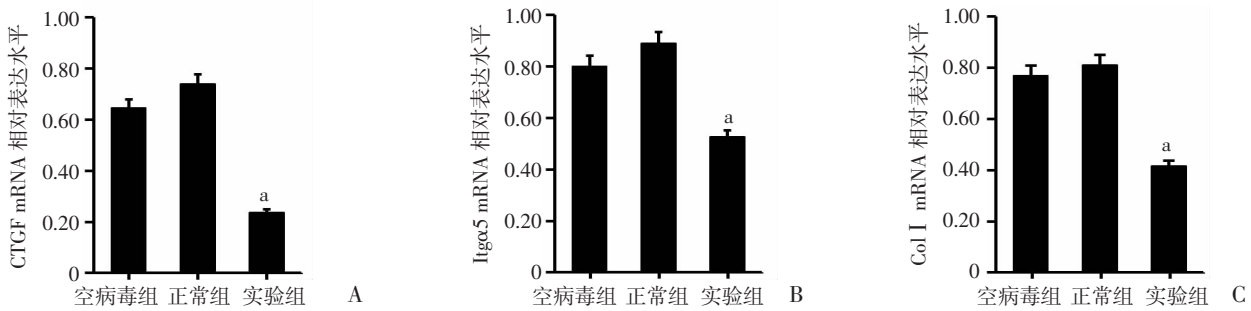
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常组或空病毒组比较

图 4 CCK-8 检测 HSC_T6 感染 CTGF-shRNA 病毒后的增殖情况



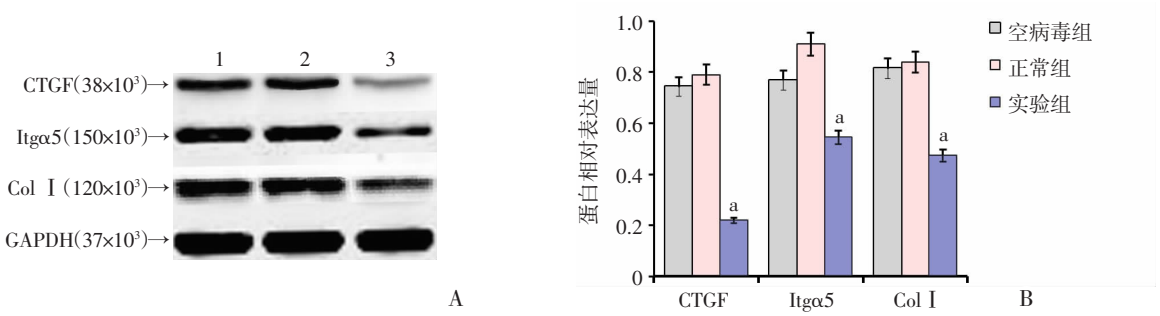
A:空病毒组;B:正常组;C:实验组

图 5 FCM 检测 HSC_T6 感染 CTGF-shRNA 病毒后的凋亡变化



a:$P<0.05$,与正常组或空病毒组比较

图 6 定量 PCR 检测 HSC_T6 感染 CTGF-shRNA 病毒后的 CTGF(A)、Itgα5(B)和 Col Ⅰ(C) mRNA 表达



A: Western blot 检测 CTGF、Itgα5 及 Col Ⅰ蛋白表达 1:空病毒组;2:正常组;3:实验组;B:CTGF、Itgα5 及 Col Ⅰ蛋白表达的定量分析 a:$P<0.05$,与正常组或空病毒组比较

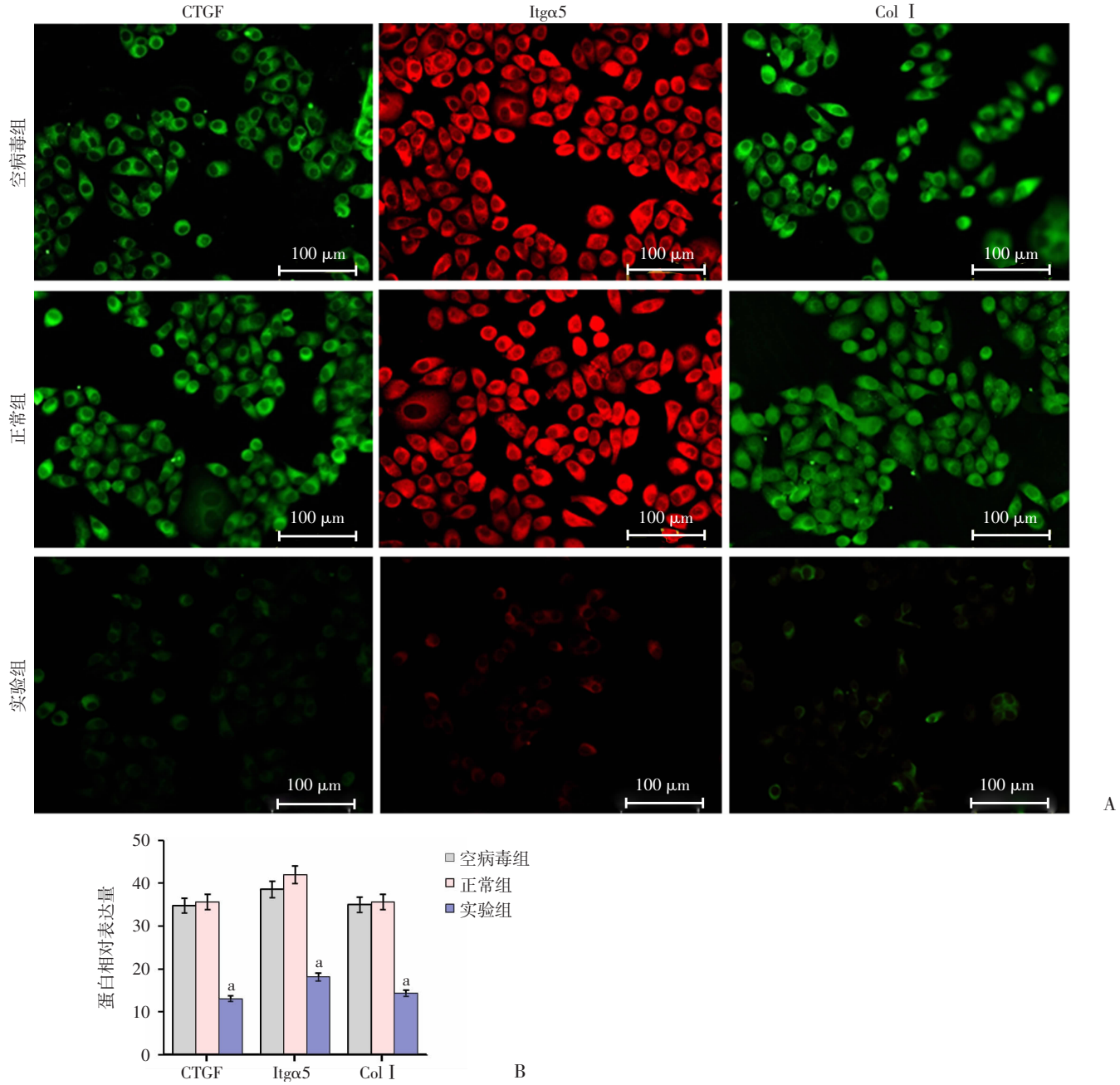
图 7 Western blot 检测 HSC_T6 感染 CTGF-shRNA 病毒后的 CTGF、Itgα5 和 Col Ⅰ蛋白表达

3 讨论

肝内 ECM 异常沉积,结缔组织过度增生,进而形成 HF。HF 是肝硬化与肝癌的共同病理过程[12-13]。ECM 主要源于活化的 HSC[14]。在肝内,HSC 常处于静息状态,数量较少,仅为肝细胞总数的 5%~8%。肝脏发生急、慢性损伤时,HSC 迅速活化、增殖,大量分泌以 Col Ⅰ为主的 ECM,促进 HF 的形成与发展,Col Ⅰ为 HF 的主要 ECM 之一。同时,肝脏功能与结构等发生异变,最终出现肝衰竭、肝硬化及肝癌等病变[15]。HF 的各种病因均以 HSC 为靶向,推动 HF 进程。HSC 是 HF 发生与发展的中心环节。

HSC_T6 源于 HSC,是原代大鼠 HSC 经 SV40-T 抗原感染而成,能分泌 Col Ⅰ等 ECM,常用作 HF 研究的模型细胞[16]。本研究结果显示,未经感染的 HSC_T6,较好表达 Col Ⅰ,与文献报道相一致。经 CTGF-shRNA 病毒感染的 HSC_T6,其胞体稍变小、变圆,表面略见粗糙,其 Col Ⅰ的表达在基因与蛋白水平明显下调。

PCNA 的表达与细胞的生长、增殖紧密关联,其在细胞内的变化情况可反映细胞生长、增殖的优、劣状态。阻抑 HSC 的活化、增殖,促使其凋亡,是防治 HF 的重要策略之一。本研究结果表明,未经感染或空病毒感染的 HSC_T6 较好表达 PCNA,经 CTGF-shRNA 病毒感染的 HSC_T6,其 PCNA 的表达明显下调,其凋亡率亦显著增加。结果提示,沉默 CTGF 可削弱 HSC 的活化与生长,进而阻抑 HF 的发生与发展。



A:免疫荧光细胞化学检测 CTGF、Itgα5 及 Col Ⅰ蛋白表达;B:CTGF、Itgα5 及 Col Ⅰ蛋白表达的定量分析 a:$P<0.05$,与正常组或空病毒组比较

图 8 免疫荧光细胞化学检测 HSC_T6 感染 CTGF-shRNA 病毒后的 CTGF、Itgα5 和 Col Ⅰ蛋白表达

CTGF 又名 CCN2,属最早的 CCN 家族(Cyr61、CTGF 及 nov)成员之一,含 349 个氨基酸残基,其半胱氨酸含量丰富,是与纤维化密切关联的一种基质细胞蛋白。Itgα5 是整合素受体中的重要一员,参与纤维蛋白原纤维生成,促进成纤维细胞和 ECM 相互作用[17]。在纤维化过程中,CTGF 对 Itgα5 的表达具正向调控作用。用三苯氧胺诱导的 Cre-loxP 系统缺失 CTGF 基因外显子 4,可下调 3,5-二乙氧羰基-1,4-二氢吡啶(DDC)诱导的肝损伤小鼠肝脏中整合素 αvβ6 的表达。采用 CTGF 中和剂让 CTGF 减少或缺乏也可下调该肝损伤模型中整合素 αvβ6 的表达。本研究结果也显示,沉默 CTGF 的 HSC_T6 也能下调其 Itgα5 的表达,与文献报道相一致。同时,CTGF 的表达也受 Itgα5 的正向调控。在气道纤维化中,Itgα5 能促使 CTGF 上调,Itgα5 抑制剂可下调 CTGF 和 α-SMA 的表达。表没食子儿茶素-3-没食子酸盐可通过抑制 αvβ1、αvβ3

和 αvβ5 整合素进而阻抑凝血酶诱导的人颊黏膜成纤维细胞中 CCN2 的合成[18]。过表达 CTGF 的人脐静脉内皮细胞的培养上清液可刺激成纤维细胞的应力纤维的形成,该应力纤维的形成可被抗整合素 αVβ3 的功能性阻断抗体所抑制[19]。高机械应力可通过激活 CCN2/整合素 α5β1 信号传导诱导软骨细胞纤维化,阻断 CCN2 或整合素 α5β1 的表达可延缓该纤维化进程[5]。CTGF 和整合素 αvβ6 的单抗独自使用均可缓解临床患者的肺纤维化。可见 CTGF/Itgα5 信号通路在纤维化形成中具有举足轻重的作用,CTGF、Itgα5 的相互作用与纤维化的发生、发展及转归紧密相关,但该通路如何影响 HF 的发生与发展,仍需进一步研究。

正常肝脏的 CTGF 水平较低,在 HF 和肝损伤动物模型组织中显著升高[20-21]。HF 发展过程中,CTGF 可由多种细胞产生,其中 HSC 对 CTGF 的持续表达和作用尤为重要,该过程主要由 CTGF 驱动,通过其直接或间接与其他分子相互作用,促进 HSC 的活化、增殖、存活、迁移、黏附和 ECM 的沉积,从而促进 HF 的形成[22-23]。肝损伤及 HF 发生、发展时 Itgα5 也明显高表达,此时,也应该存在 CTGF 和 Itgα5 的直接或间接的相互作用,可以推测,CTGF、Itgα5 间的相互作用将进一步加剧 HSC 的活化、增殖与 ECM 的分泌与沉积,导致 HF 的最终形成。因此,如何通过干预 CTGF、Itgα5 间的相互作用以影响 HSC 的生物学行为,尤其通过沉默 CTGF 分子,调控 CTGF/Itgα5 信号通路,能否有效抑制或阻断 HF 尚不清楚。本研究结果证实,沉默 CTGF 的 HSC_T6,其 CTGF、Itgα5 及 Col Ⅰ在基因与蛋白水平的表达均显著下调,其生长明显受抑,凋亡率明显增加。这些结果提示,沉默 CTGF,干预 CTGF/Itgα5 信号通路,可调控 HSC 的生物学行为,进而阻抑 HF 的发生与发展。

综上所述,干扰 CTGF 的表达,影响 CTGF/Itgα5 信号通路的调控,可削弱 HSC 活化与增殖,诱导其凋亡,降低其 ECM 分泌,进而阻抑 HF 的形成。本研究仅在细胞水平予以初步探讨,其动物实验和临床效果是否与此一致,尚需下一步研究证实。

参考文献:

[1] HIGASHI T, FRIEDMAN S L, HOSHIDA Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev. 2017, 121(1): 27-42. DOI:10.1016/j.addr.2017.05.007.

[2] MU M, ZUO S, WU R M, *et al*. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation *via* inhibition of TGF-β/Smad signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 4107-4115. DOI: 10.2147/DDDT.S186726.

[3] PI L Y, ROBINSON P M, JORGENSEN M, *et al*. Connective tissue growth factor and integrin αvβ6: a new pair of regulators critical for ductular reaction and biliary fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2015, 61(2): 678-691. DOI: 10.1002/hep.27425.

[4] HENDERSON N C, ARNOLD T D, KATAMURA Y, *et al*. Targeting of αv integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs[J]. Nat Med, 2013, 19(12): 1617-1624. DOI: 10.1038/nm.3282.

[5] HUANG Y Z, ZHAO L, ZHU Y, *et al*. Interrupting TGF-β1/CCN2/integrin-α5β1 signaling alleviates high mechanical-stress caused chondrocyte fibrosis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2021, 25(3):1233-1241. DOI: 10.26355/eurrev_202102_24827.

[6] SEO H Y, LEE S H, LEE J H, *et al*. Src inhibition attenuates liver fibrosis by preventing hepatic stellate cell activation and decreasing connetive tissue growth factor[J]. Cells, 2020, 9(3): 558. DOI:10.3390/cells9030558.

[7] SEO H Y, JUNG Y A, LEE S H, *et al*. Kahweol decreases hepatic fibrosis by inhibiting the expression of connective tissue growth factor *via* the transforming growth factor-beta signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(50): 87086-87094. DOI: 10.18632/oncotarget.19756.

[8] VERBEKE L, MANNAERTS I, SCHIERWAGEN R, *et al*. FXR agonist obeticholic acid reduces hepatic inflammation and fibrosis in a rat model of toxic cirrhosis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 33453. DOI: 10.1038/srep33453.

[9] 张荣华, 董岸莺, 柏干苹, 等. 沉默结缔组织生长因子基因对肝星状细胞生长和细胞周期的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2019, 39(12): 1375-1381. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.12.006.
ZHANG R H, DONG A Y, BAI G P, *et al*. Effects of connective tissue growth factor gene-silencing on cell growth and cell cycle of hepatic stellate cells[J]. J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci, 2019, 39(12): 1375-1381. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.12.006.

[10] 张荣华, 闫国和, 汪国建, 等. 沉默转化生长因子 β1 对肝星状细胞-T6 生长及增殖的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2014, 34(9): 1315-1318, 1324. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2014.09.012.
ZHANG R H, YAN G H, WANG G J, *et al*. Effects of silencing TGFβ1 on growth and proliferation of hepatic stellate cell line T6[J]. J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci, 2014, 34(9): 1315-1318, 1324. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2014.09.012.

[11] BAI G P, YAN G H, WANG G J, *et al*. Anti-hepatic fibrosis effects of a novel turtle shell decoction by inhibiting hepatic stellate cell proliferation and blocking TGF-β1/Smad

signaling pathway in rats[J]. Oncol Rep, 2016, 36(5): 2902-2910. DOI: 10.3892/or.2016.5078.

[12] TSUCHIDA T, LEE Y A, FUJIWARA N, *et al*. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer[J]. J Hepatol, 2018, 69(2): 385-395. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.03.011.

[13] AFFO S, YU L X, SCHWABE R F. The role of cancer-associated fibroblasts and fibrosis in liver cancer[J]. Annu Rev Pathol, 2017, 12: 153-186. DOI: 10.1146/annurev-pathol-052016-100322.

[14] BAI G P, YAN G H, WANG G J, *et al*. Effects of lentiviral vector-mediated shRNA silencing of TGFβ1 on the expression of Col1a1 in rat hepatic stellate cells[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(3): 2785-2790. DOI: 10.3892/mmr.2017.6945.

[15] XIANG D, ZOU J, ZHU X, *et al*. Physalin D attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad and YAP signaling[J]. Phytomedicine. 2020, 78: 153294. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153294.

[16] BU F T, CHEN Y, YU H X, *et al*. SENP2 alleviates CCl_4-induced liver fibrosis by promoting activated hepatic stellate cell apoptosis and reversion[J]. Toxicol Lett, 2018, 289: 86-98. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.03.010.

[17] ZHANG Y, REIF G, WALLACE D P. Extracellular matrix, integrins, and focal adhesion signaling in polycystic kidney disease[J]. Cell Signal, 2020, 72: 109646. DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109646.

[18] CHANG J Z, HSIEH Y P, LIN W H, *et al*. Activation of transforming growth factor-β1 by thrombin *via* integrins αvβ1, αvβ3, and αvβ5 in buccal fibroblasts: Suppression by epigallocatechin-3-gallate[J]. Head Neck. 2017, 39(7): 1436-1445. DOI: 10.1002/hed.24791.

[19] LEE S Y. Endothelial cell-derived connective tissue growth factor stimulates fibroblast differentiation into myofibroblasts through integrin αVβ3[J]. Exp Ther Med, 2023, 25(1): 30. DOI: 10.3892/etm.2022.11730.

[20] MAKINO Y, HIKITA H, KODAMA T, *et al*. CTGF mediates tumor-stroma interactions between hepatoma cells and hepatic stellate cells to accelerate HCC progression[J]. Cancer Res, 2018, 78(17): 4902-4914. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3844.

[21] RAMPA DR, FENG H, ALLUR-SUBRAMANIYAN S, *et al*. Kinin B1 receptor blockade attenuates hepatic fibrosis and portal hypertension in chronic liver diseases in mice[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 590. DOI: 10.1186/s12967-022-03808-7.

[22] YU B, JIN G N, MA M, *et al*. Taurocholate induces connective tissue growth factor expression in hepatocytes through ERK-YAP signaling[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(5): 1711-1725. DOI: 10.1159/000494790.

[23] CHEN W, LI Y X, HSU C T, *et al*. Connective tissue growth factor in hepatocytes is elevated by carbon tetrachloride *via* STAT3 activation[J]. Mol Med Rep, 2020, 21(3): 1390-1398. DOI: 10.3892/mmr.2020.10916.

(**收稿**:2023-08-18;**修回**:2023-11-17)

(编辑 张艺霖)