

论著·基础研究

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

张荣华¹, 董岸莺², 柏干萍¹, 万萍¹, 蒋毅¹, 吴红¹

1. 陆军军医大学西南医院中医与风湿免疫科, 重庆 400038; 2. 库尔勒解放军 951 医院心肾呼吸科, 库尔勒 841000

[摘要] 目的·探讨沉默结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, *Ctgf*) 基因对大鼠肝星状细胞 HSCT6 的生长、细胞周期及其转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1)、Smad3 和 Smad7 表达的影响。方法·采用 RNA 干扰技术构建 *Ctgf* 基因的 pCDH/Ctgf-shRNA 重组慢病毒载体。该重组载体经病毒包装后获得高感染力的 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒颗粒用于感染 HSCT6 细胞。荧光显微镜观测被感染 HSCT6 细胞的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达情况; CCK-8 试剂盒检测被感染 HSCT6 细胞的生长变化; 流式细胞术检测被感染 HSCT6 细胞的周期变化。Real-time PCR 和 Western blotting 分别检测 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒对 HSCT6 细胞的 *Ctgf* 基因的沉默效应及对 TGF-β1、Smad3 和 Smad7 表达的影响。结果·成功构建 *Ctgf* 基因的重组病毒载体 pCDH/Ctgf-shRNA。荧光显微镜观测表明, 被感染重组病毒的 HSCT6 细胞显著表达 GFP。CCK-8 检测结果证实, 与对照细胞相比, 沉默 *Ctgf* 基因的 HSCT6 细胞生长明显受抑, 72 h 开始两者差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。流式细胞术检测表明, 沉默 *Ctgf* 基因的 HSCT6 细胞可被阻滞于 S 期。Real-time PCR 和 Western blotting 检测表明, pCDH/Ctgf-shRNA 病毒能有效沉默 HSCT6 细胞的 *Ctgf* 基因, 下调 TGF-β1、Smad3 基因及其蛋白的表达, 上调 Smad7 基因及其蛋白的表达; 与对照比较, 差异皆有统计学意义 (均 $P<0.05$)。结论·沉默 *Ctgf* 基因能抑制 HSCT6 细胞生长, 使其 TGF-β1、Smad3 的表达下调, 同时上调其 Smad7 的表达; 这种生长受抑可能与其 TGF-β1/Smads (Smad3/Smad7) 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; 转化生长因子-β1; Smad3; Smad7

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.12.006 **[中图分类号]** R575.2 **[文献标志码]** A

Effects of connective tissue growth factor gene-silencing on cell growth and cell cycle of hepatic stellate cells

ZHANG Rong-hua¹, DONG An-ying², BAI Gan-ping¹, WAN Ping¹, JIANG Yi¹, WU Hong¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine and Rheumatology, Southwest Hospital, the Army Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China 2. Department of Heart, Kidney and Respiration, No.951 Hospital of PLA, Korla 841000, China

[Abstract] Objective·To investigate the effects of silencing connective tissue growth factor (*Ctgf*) gene on the growth, cell cycle and the expression of TGF-β1, Smad3 and Smad7 of rat hepatic stellate cell line HSCT6. Methods·The recombinant lentivirus vector pCDH/Ctgf-shRNA of *Ctgf* gene was constructed by RNA interference. The recombinant vector was packaged to obtain highly infectious pCDH/Ctgf-shRNA lentivirus particles for HSCT6 infection. The expression of green fluorescent protein (GFP) in the transfected HSCT6 cells was observed under fluorescence microscope. The effects of Ctgf-shRNA lentivirus on the growth of HSCT6 cells were tested by CCK-8. The effects of Ctgf-shRNA lentivirus on the cell cycle of HSCT6 cells were analyzed by flow cytometry (FCM). The effects of Ctgf-shRNA lentivirus on the expression of mRNA of *Ctgf*, *Tgf-β1*, *Smad3* and *Smad7*, and their proteins in HSCT6 cells were detected by real-time PCR and Western blotting, respectively. Results·The lentiviral vector pCDH/Ctgf-shRNA has been constructed successfully. The HSCT6 cells transfected by Ctgf-shRNA lentivirus significantly expressed GFP under fluorescence microscope. The results of CCK-8 confirmed that the growth of HSCT6 cells transfected by Ctgf-shRNA lentivirus was slower than that of controls and the differences were statistically significant after being cultured for 72 h ($P<0.05$). The results of FCM revealed that the growth of HSCT6 cells transfected by Ctgf-shRNA lentivirus was blocked in the S phase of cell cycle. The results of real-time PCR and Western blotting showed that the Ctgf-shRNA lentivirus effectively silenced *Ctgf* gene, down-regulated the expression of genes and encoding proteins of TGF-β1, and Smad3 of HSCT6 and up-regulated the expression of genes and encoding proteins of Smad7 of HSCT6 cells. The differences between transfected cells and controls were statistically significant ($P<0.05$). Conclusion·Silencing *Ctgf* gene can effectively inhibit the growth of HSCT6 cells, down-regulate the expression of TGF-β1 and Smad3 and up-regulate the expression of Smad7. The inhibition of the growth of HSCT6 cells may be closely related to interference of the TGF-β1/Smads (Smad3 and Smad7) signaling pathway.

[Key words] connective tissue growth factor (CTGF); hepatic stellate cell; transforming growth factor-β1 (TGF-β1); Smad3; Smad7

[基金项目] 国家自然科学基金 (81273918); 基础研究军民融合项目 (SWH2017JCZD-5); 军队中医药科研专项课题 (2010YZZ231); 重庆市中医药科技项目 (2012-2-63) (National Natural Science Foundation of China, 81273918; Basic Research Military-Civil Integration Project, SWH2017JCZD-5; Specific Project of Traditional Chinese Medicine of Chinese PLA, 2010YZZ231; Project of Traditional Chinese Medicine Science and Technology of Chongqing, 2012-2-63)。

[作者简介] 张荣华 (1962—), 女, 教授, 主任医师, 博士; 电子信箱: zhrhlgg@163.com。

[通信作者] 同上。



肝硬化是常见于临床的多发性进行性慢性病。肝内结缔组织持续异常增生便形成肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF)。多种慢性进行性肝病发展为肝硬化的过程中, HF 是其必经之病理生理过程。HF 发展的核心环节是肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 的活化及增殖^[1]。活化的 HSC 使细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成、分泌增多, 以促进肝纤维化的形成。

转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 是活化 HSC 并促使其分泌 ECM 的重要细胞因子。在 HF 过程中, TGF- $\beta 1$ 是其“开关性”元件^[2], 主要经 TGF- β /Smad 通路在其中发挥关键性调节作用。TGF- $\beta 1$ 是防治 HF 的核心靶标之一。

结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 作为 TGF- $\beta 1$ 的下游元件, 参与多器官的纤维化^[3-4], 可特异性地介导 TGF- $\beta 1$ 的 HF 促进作用, 还能直接促使 ECM 的合成和分泌。但 CTGF 是如何影响 TGF- β /Smad 通路以介导 TGF- $\beta 1$ 的 HF 促进作用尚不清楚。

为进一步探讨 CTGF 与 TGF- β /Smad 通路的相关性, 本文首先构建携带 *Ctgf* 基因的慢病毒, 用以沉默大鼠肝星状细胞株 HSCT6 的 *Ctgf* 基因。随后检测与分析被沉默 *Ctgf* 基因细胞的增殖、周期及 TGF- $\beta 1$ 、Smad3、Smad7 在 mRNA 与蛋白水平的表达变化, 以期为 HF 的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

大鼠肝星状细胞株 HSCT6 购自中国科学院昆明细胞库; CTGF、Smad7 抗体购自美国 Santa 公司; TGF- $\beta 1$ 、Smad3 抗体购自美国 Abcam 公司; 3 个干扰靶点 DNA 序列及其对照序列由中国瑞博公司合成; 限制性内切酶、Taq 聚合酶、T4 DNA 连接酶、反转录 PCR 试剂盒、real-time PCR 试剂盒购自中国宝生物公司; 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自美国 Roche 公司; 基因转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; CCK-8 试剂盒购自日本 Toyobo 公司; pCDH 慢病毒载体、shRNA 合成、引物合成及测序由中国捷瑞公司提供和完成。

1.2 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基常规培养 HSCT6 细胞。待其融合至 85% 左右时, PBS 冲洗, 胰酶消化传代培养, 备后续实验用。

1.3 慢病毒载体 pCDH/Ctgf-shRNA 的构建、鉴定、包装、滴度测定和细胞感染

1.3.1 慢病毒载体 pCDH/Ctgf-shRNA 的构建和鉴定 参考文献^[5] 构建 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒。针对大鼠 *Ctgf* mRNA 序列 (BC072503.1) 设计与合成 3 个靶点及对照 (靶点 1, 5'-CGGGTTACCAATGACAATA-3'; 靶点 2, 5'-CAGAATGACAGGAAAGAGA-3'; 靶点 3, 5'-GTTGTCT-CCAGAAATATCT-3'; 对照, 5'-GTATCGGACGCCTGGTTA-3') 的干扰小 RNA (small interfering RNA, siRNA)。通过实验筛选获得最佳 siRNA 的靶序列。设计、合成针对最佳 siRNA 靶序列的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA), 将其插入慢病毒载体 pCDH 的 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切位点间, 构建 pCDH/Ctgf-shRNA 慢病毒, 并予鉴定。

1.3.2 重组病毒 pCDH/Ctgf-shRNA 的包装和滴度测定 参照文献^[5] 进行重组慢病毒 pCDH/Ctgf-shRNA 的包装和滴度测定。简言之, 将 pCDH/Ctgf-shRNA 质粒转入 HEK293 细胞行病毒包装, 荧光倒置显微镜观测被包装细胞内绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达情况。为提高病毒滴度, 将包装有 pCDH/Ctgf-shRNA 质粒的病毒细胞, 经 5 次 (第 2 次开始, 包装细胞经病毒上清液重复感染, -80 °C 反复冻融) 传代扩增, 随后大量扩增, 用倍比稀释法测试其病毒滴度。

1.3.3 HSCT6 细胞的 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒感染 常规培养 HSCT6 细胞, 待其呈 65% ~ 85% 融合时, 用感染复数 (MOI) 为 100 的 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒感染 (为实验组), 分别以未感染、空病毒感染的 HSCT6 细胞作空白对照 (正常组) 与阴性对照 (空病毒组)。感染 48 ~ 72 h 后, 其培养液换为新鲜无血清培养基, 在荧光倒置显微镜下对被感染细胞的 GFP 表达进行拍照。采用有 GFP 表达细胞的百分比及 real-time PCR 与 Western blotting 检测结果评估其感染效率, 占比达 90% 以上及能有效沉默 *Ctgf* 者用于后续检测。

1.4 沉默 *Ctgf* 基因对 HSCT6 细胞生长的影响

分别收集经 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒感染 72 h 的各组细胞 (实验组、空病毒组与正常组), 制备成单细胞悬液后接种于 96 孔板 (3×10^3 个/孔) 中, 每组细胞设置 4 个复孔。继续培养 24、48、72 与 96 h 后, 分别添加 (10 μ L/孔) CCK-8 试剂, 继续培养 4 h, 取出稍加振荡、混匀, 采用酶标仪分别检测 450 nm 波长处各孔的光密度 (D) 值, 以此 D 值为 Y 轴, 培养时间 (h) 为 X 轴, 分别绘制各组细胞的生长曲线图。该实验重复至少 3 次。

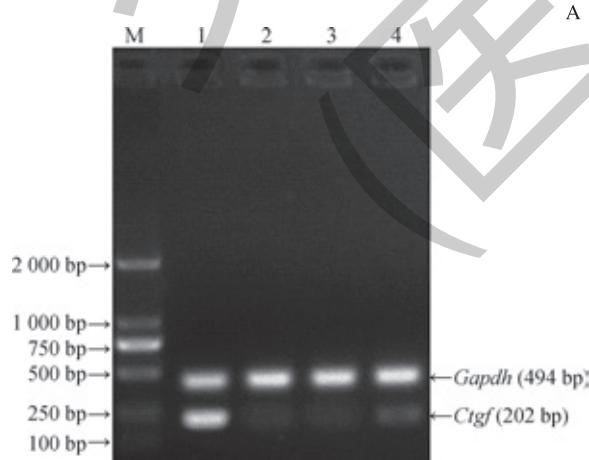
1.5 沉默 *Ctgf* 基因对 HSCT6 细胞周期的影响

参照我们的前期实验^[6]检测沉默 *Ctgf* 对 HSCT6 细胞周期的影响。简言之, 收集各组细胞(与 1.4 相同), 4 ℃, 111.8 × g, 离心 5 min, 计数细胞后, 经 80% 乙醇(4℃预冷)固定 48 h。常规 PI 染色, 流式细胞术检测(激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm)各组细胞周期变化。用 Multicycle software 分析数据。实验至少重复 3 次。

1.6 沉默 *Ctgf* 基因对 HSCT6 细胞的 *Tgf-β1*、*Smad3* 和 *Smad7* 基因及其编码蛋白表达的影响

分别设计和合成大鼠 *Tgf-β1* (NM_021578.2)、*Smad3* (NM_013095.3) 及 *Smad7* (NM_030858.1) 基因的定量 PCR 检测引物(表 1)。以各组 HSCT6 细胞总 RNA 为模板, 定量 PCR 分别检测其 *Tgf-β1*、*Smad3* 及 *Smad7* 的表达情况, *Gapdh* 为内参。

收集各组 HSCT6 细胞, 分别提取与定量各组细胞总蛋白。经 SDS-PAGE 分离蛋白, 并转移至硝酸纤维膜上。分别浸入含 TGF-β1—抗(1:600)、Smad3—抗(1:400)与 Smad7—抗(1:700)的封闭液内过夜(4 ℃), 随后各自加入相应的二抗(适当稀释)孵育 2.5 h(室温), 并与底物适度结合, GAPDH 为内参。实验至少重复 3 次。



注: A. 反转录 PCR 检测结果 [1 为对照, 2 为靶点 1, 3 为靶点 2, 4 为靶点 3, M 为 DNA 标准 (DL 2000)]; B. 定量分析, ^① P=0.000, 与对照比较

图 1 *Ctgf* mRNA 3 个靶点 RNA 干扰的电泳分析
Fig 1 Electrophoresis analysis of three RNA interference targets of *Ctgf* mRNA

2.2 慢病毒载体 pCDH/Ctgf-shRNA 的测序鉴定

重组病毒载体 pCDH/Ctgf-shRNA 经测序表明,

表 1 定量 PCR 检测的引物序列

Tab 1 Primer sequences in quantitative PCR

基因名称	引物序列 (5' → 3')
<i>Tgf-β1</i>	
上游引物	CTTGCCTCTACAACCAACA
下游引物	CTTGCAGACCCACGTAGTAGA
<i>Smad3</i>	
上游引物	TAGCACAGGCTTTGGATG
下游引物	GAAGCAGAGACTGGGTCTC
<i>Smad7</i>	
上游引物	GTTGGTGCACAAAGTGTCC
下游引物	GAAGCTAACCTGCACGGTGA
<i>Gapdh</i>	
上游引物	TCAAGAAGGTGGTAAGCAG
下游引物	AGGTGGAAGAATGGGAGTTG

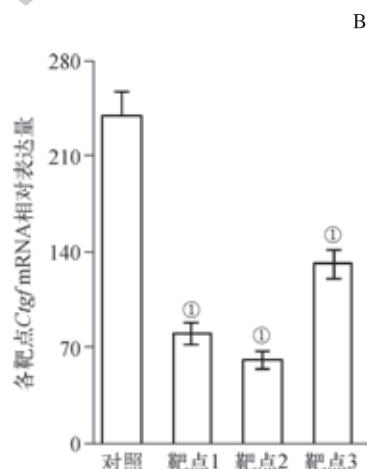
1.7 统计学方法

采用 IBM SPSS 22.0 统计学软件对实验数据进行分析, 组间比较采用 t 检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 呈现数据。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *Ctgf* 基因最佳干扰靶点序列的筛选

从 3 个靶点中, 采用反转录 PCR 法筛选最佳 RNA 干扰靶序列为 5'-CAGAATGACAGGAAAGAGA-3'(靶点 2, 图 1)。其 shRNA 序列为 5'-AATTCCAGAACATGACAGGAAAGAG-ACTTCCTGTCAGATCTCTTCCTGTCATTCTGTTTTG-3'。



shRNA 序列与前述一致(图 2), 携带 Ctgf-shRNA 的 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒载体构建成功。



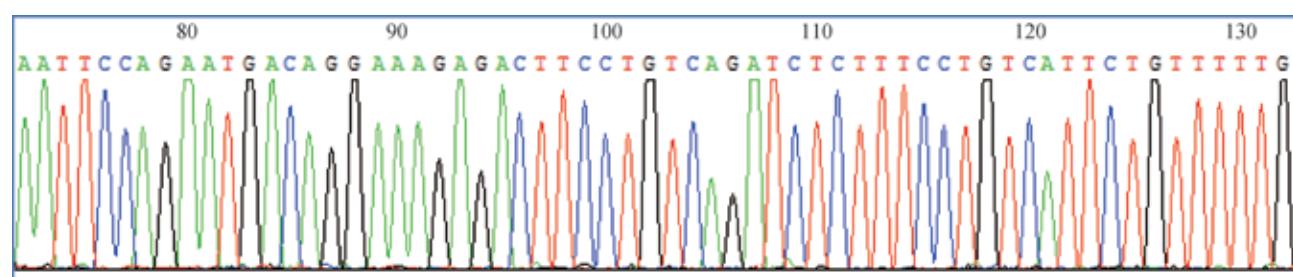


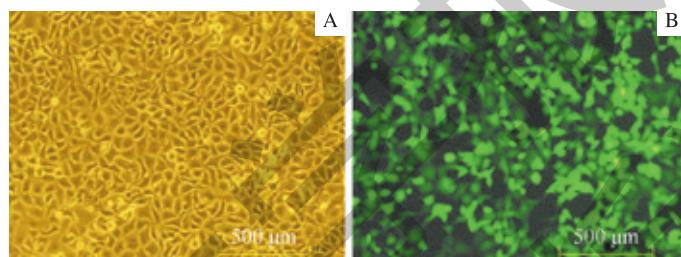
图2 重组病毒载体 pCDH/Ctgf-shRNA 的测序鉴定

Fig 2 Sequencing and identification of recombinant lentiviral vector pCDH/Ctgf-shRNA

2.3 病毒 pCDH/Ctgf-shRNA 的包装与其滴度测定

基因转染试剂 Lipofectamine 2000 介导 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒质粒 DNA 感染 HEK293 细胞(图3A), 培养

被感染细胞 48 h, 荧光倒置显微镜观察, 可见细胞高表达 GFP (图3B)。采用倍比稀释法检测到 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒滴度约 2×10^8 TU/mL。



注: A. 荧光显微镜下正常 HEK293 细胞不表达 GFP; B. 经 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒感染的 HEK293 细胞高表达 GFP

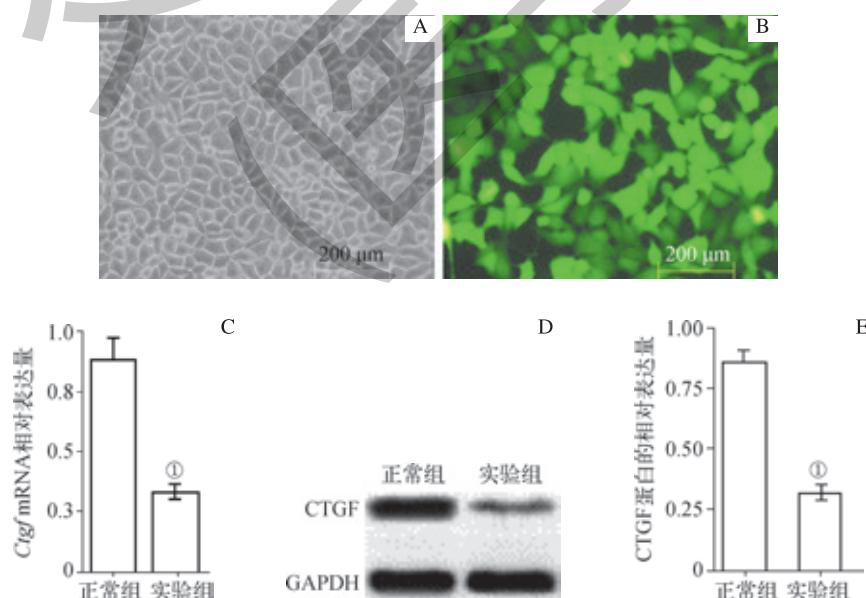
图3 重组 pCDH/CTGF-shRNA 病毒的包装

Fig 3 Recombinant lentiviral vector pCDH/CTGF-shRNA packaged with HEK293 cells

2.4 HSCT6 细胞的 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒感染率检测

倒置荧光显微镜观测证实, HSCT6 细胞经重组病毒 pCDH/Ctgf-shRNA 感染 48~72 h, 其感染率达 98% 以上

(图4A、B)。Real-time PCR 和 Western blotting 检测显示, 其 *Ctgf* 沉默效果明显 (图4C~E)。



注: A~B. 荧光显微镜下未经 Ctgf-shRNA 病毒感染 (A) 与经感染 (B) 的 HSCT6 细胞; C~E. Real-time PCR (C)、Western blotting (D) 检测结果及其定量分析 (E)。P=0.000, 与正常组比较

图4 HSCT6 细胞的重组慢病毒感染率

Fig 4 Recombinant lentivirus infection rate in HSCT6 cells

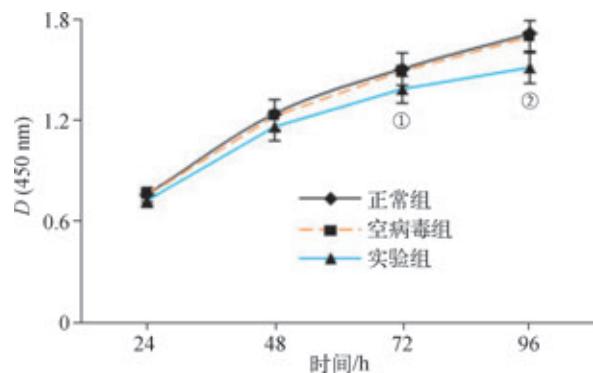


2.5 沉默 *Ctgf* 基因对 HSCT6 细胞生长的影响

CCK-8 检测证实, 经 pCDH/Ctgf-shRNA 病毒感染的 HSCT6 细胞的生长慢于未感染或经空病毒感染的 HSCT6 细胞, 72 h 开始两者差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (图 5)。

2.6 沉默 *Ctgf* 对 HSCT6 细胞周期的影响

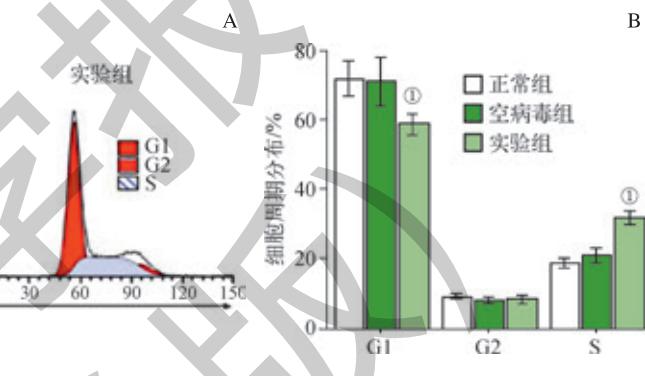
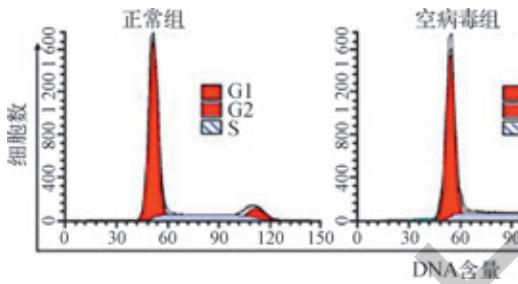
流式细胞术检测证实, 与空病毒感染或未感染的 HSCT6 细胞比较, Ctgf-shRNA 病毒感染的 HSCT6 细胞, 其细胞周期的 S 期显著延长, G1 期明显缩短 (图 6) (均 $P<0.01$)。该结果提示, 沉默 *Ctgf* 基因的 HSCT6 细胞, 被阻滞于 S 期。



注: ^① $P=0.037$, ^② $P=0.005$, 与正常组比较

图 5 沉默 *Ctgf* 对 HSCT6 细胞生长的影响

Fig 5 Effect of silenced *Ctgf* on the growth of HSCT6 cells



注: A. 流式细胞术检测结果; B. 定量分析。 $P=0.000$, 与正常组比较

图 6 沉默 *Ctgf* 对 HSCT6 细胞周期的影响

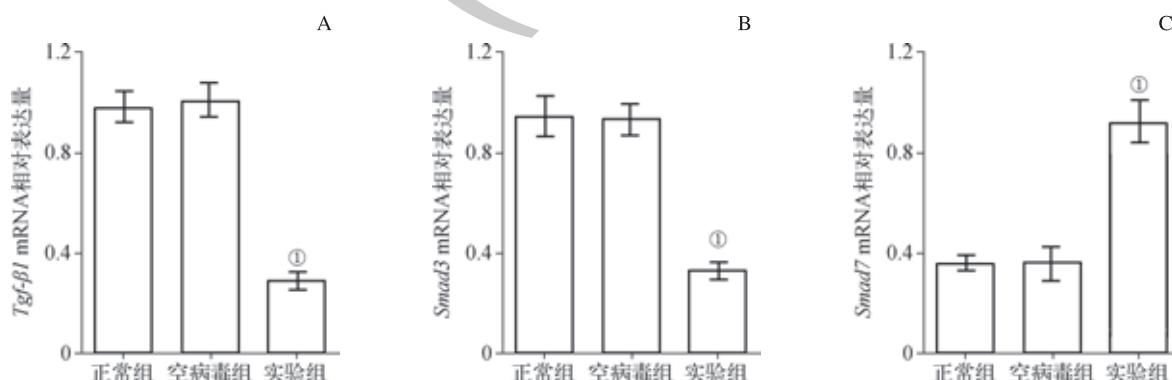
Fig 6 Effect of silencing *Ctgf* gene on the cell cycle of HSCT6 cells

2.7 沉默 *Ctgf* 对 HSCT6 细胞 *Tgf-β1*、*Smad3* 和 *Smad7* mRNA 及其蛋白表达的影响

重组病毒 pCDH/Ctgf-shRNA 感染 HSCT6 细胞 72 h 后, 分别采用 real-time PCR 和 Western blotting 法检测 HSCT6 细胞中 *Tgf-β1*、*Smad3* 和 *Smad7* mRNA 及其蛋白的表达变化。

Real-time PCR (图 7) 与 Western blotting (图 8) 检

测证实, 经重组病毒 pCDH/Ctgf-shRNA 感染的 HSCT6 细胞中 *Tgf-β1*、*Smad3* 的 mRNA 及其蛋白表达均较空病毒感染和未感染细胞明显下调 (均 $P<0.05$), *Smad7* 的 mRNA 及其蛋白表达则显著上调 ($P<0.05$); 而空病毒感染及未感染细胞中三者的相应表达差异不具有统计学意义。此结果提示, 沉默 *Ctgf* 抑制肝纤维化的机制之一可能和干扰 TGF-β1/Smads 信号通路密切相关。

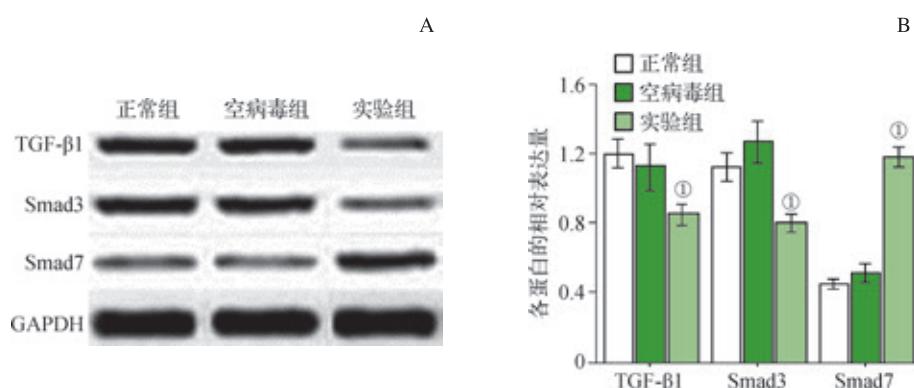


注: $P=0.000$, 与正常组比较

图 7 Real-time PCR 检测沉默 *Ctgf* 对 HSCT6 的 *Tgf-β1* (A)、*Smad3* (B) 和 *Smad7* (C) mRNA 表达的影响

Fig 7 Effect of silencing *Ctgf* gene on the expressions of *Tgf-β1* (A), *Smad3* (B) and *Smad7* (C) mRNA of HSCT6 cells detected by real-time PCR





注: A. Western blotting 检测结果; B. 定量分析。P=0.000, 与正常组比较

图8 沉默 *Ctgf* 对 HSCT6 细胞 TGF- β 1、Smad3 和 Smad7 蛋白表达的影响

Fig 8 Effect of silencing *Ctgf* gene on the expressions of TGF- β 1, Smad3 and Smad7 protein in HSCT6 cells

3 讨论

HF 是肝内 ECM 合成和降解失调，并过度沉积，进而致肝内结缔组织异常增生的一类肝病。ECM 主要合成与分泌于 HSC^[7]。正常情况下，HSC 在肝内数目较少，仅占肝细胞总数的 5% ~ 8%，为静息状态。当肝损伤时，HSC 大量活化、增殖，其表型发生改变，致使 ECM 过度沉积、肝胶原构成比异变，以促使 HF 发展变化；同时肝功能、结构发生改变，最终肝硬化形成、肝衰竭发生^[8]。HSC 是各种 HF 致病因素的靶标，是 HF 发生、发展的核心细胞。HSCT6 为活化的鼠 HSC，是经大鼠 SV40-T 抗原感染原代鼠 HSC 所得，能表达、分泌胶原，是比较理想的 HF 研究用细胞模型^[9-10]。

HF 过程中活化的 HSC，其增殖活性明显增强的同时，致纤维化和促炎性细胞因子，如 CTGF、TGF- β 1 等的合成与分泌亦显著增多，以促进 HF 的形成^[11-12]。CTGF 在 HF 组织中随纤维化进程呈持续、明显高表达。可见下调 CTGF 的表达，减弱 HSC 的活性与生长，将有助于阻抑 HF 的发展。为此，我们采用 RNA 干扰技术构建了负载 *Ctgf*-shRNA 的病毒载体。倒置荧光显微镜、定量 PCR 及 Western blotting 检测显示，该载体对 HSCT6 细胞实现了成功感染，其 *Ctgf* 基因及蛋白得以有效下调。CCK-8 检测表明，沉默 *Ctgf* 基因的 HSCT6，其生长明显受抑。细胞周期检测证实，沉默 HSCT6 的 *Ctgf* 基因，可将其阻滞于 G1 期。

TGF- β 是调节 HSC 生长的一类多肽，其中 TGF- β 1 可通过自我诱导，放大自身生物效应以调节 ECM 的变

化。促使胶原与纤维连接蛋白的合成，抑制其降解，协调纤维组织的增殖和修复，并经 TGF- β /smads 通路在纤维化中行使关键作用。Smads 作为 TGF- β 下游的信号因子，在纤维化的发生、发展及其形成机制中发挥重要的调控作用。其中 Smad3 是纤维化的主要调控者，具纤维化抵抗作用，若其失调将致 TGF- β 1 的自身诱导^[13-14] 功能受挫，削弱纤维化的形成。TGF- β 1 活化后促使 Smad3 以磷酸化的方式在 HSC 核内发挥相应基因的调控作用，并诱导 HSC 转化为肌成纤维细胞样细胞 (muscle fibroblast like cell, MFC)。Smad7 为 TGF- β /Smads 通路的关键阻抑因子，其异常表达将改变 TGF- β 1 的活性，进而调控纤维化发生、发展^[15]。各 Smads 分子在 TGF- β /Smads 通路中精密协调，共同介导病理生理过程中 TGF- β 的生物学作用^[16]。

TGF- β 1 是 HF 重要的始动因子。在 HF 过程中，TGF- β 1 活化 HSC，促进胶原的表达、ECM 的合成与堆积。研究^[4, 17]发现，TGF- β 1 可特异诱导 CTGF 的表达，而 CTGF 作为 TGF- β 1 的下游效应介质，在 HF 过程中发挥中心环节作用。CTGF 可作为 HF 程度评估的重要标志物，并有望替代 TGF- β 1 成为防治纤维化的又一核心靶细胞因子。但其作用机制，尤其与 TGF- β /Smads 通路的关系尚不太清楚。我们采用 real-time PCR、Western blotting 检测显示，沉默 HSCT6 细胞的 *Ctgf* 导致 TGF- β 1、Smad3 在 mRNA 和蛋白水平明显受抑；同时，Smad7 在 mRNA 和蛋白水平显著高表达。因此，CTGF 可能通过调控 TGF- β /Smads 通路，抑制 HSCT6 细胞的生长得以实现在纤维化防治中的作用。

参·考·文·献

- [1] Mann DA, Marra F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells[J]. *J Hepatol*, 2010, 52(6): 949-950.
- [2] Xu L, Zheng N, He Q, et al. Puerarin, isolated from *Pueraria lobata* (Willd.), protects against hepatotoxicity via specific inhibition of the TGF- β 1/Smad signaling pathway, thereby leading to anti-fibrotic effect[J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(13): 1172-1179.
- [3] Phanish MK, Winn SK, Dockrell MK. Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2): a marker mediator and therapeutic target for renal fibrosis[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2010, 114(3): E83-E92.
- [4] Gressner OA, Gao C. Monitoring fibrogenic progression in the liver[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 410(433): 111-122.
- [5] Bai GP, Yan GH, Wang GJ, et al. Effects of lentiviral vector mediated shRNA silencing of TGF β 1 on the expression of Coll1a1 in rat hepatic stellate cells[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2785-2790.
- [6] 张荣华, 闫国利, 汪国建, 等. 鳖甲煎改良方含药血清对肝星状细胞增殖、周期及凋亡的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(8): 905-910.
- [7] Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41: 1639-1642.
- [8] Muir AJ. Understanding the complexities of cirrhosis[J]. *Clin Ther*, 2015, 37(8): 1822-1836.
- [9] Jeong EJ, Kim NH, Heo JD, et al. Antifibrotic compounds from *Liriodendron tulipifera* attenuating HSC-T6 proliferation and TNF- α production in RAW264.7 cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(2): 228-234.
- [10] Dai L, Ji H, Kong XW, et al. Antifibrotic effects of ZK14, a novel nitric oxide-donating biphenyldicarboxylate derivative, on rat HSC-T6 cells and CCl4-induced hepatic fibrosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(1): 27-34.
- [11] Bian EB, Zhao B, Huang C, et al. New advances of DNA methylation in liver fibrosis, with special emphasis on the crosstalk between microRNAs and DNA methylation machinery[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(9): 1837-1844.
- [12] Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, et al. Decoding cell death signals in liver inflammation[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(3): 583-594.
- [13] Nan L, Jacko AM, Tan J, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L5 promotes TGF- β 1 signaling by de-ubiquitinating and stabilizing Smad2/Smad3 in pulmonary fibrosis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33116.
- [14] Lytle KA, Depner CM, Wong CP, et al. Docosahexaenoic acid attenuates Western diet-induced hepatic fibrosis in *Ldlr*^{-/-} mice by targeting the TGF- β /Smad3 pathway[J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(10): 1936-1946.
- [15] Zhao J, Shi W, Chen H, et al. Smad7 and Smad6 differentially modulate transforming growth factor β -induced inhibition of embryonic lung morphogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(31): 23992-23997.
- [16] Chung AC, Dong Y, Yang W, et al. Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of TGF- β /Smad3-regulated microRNAs[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(2): 388-398.
- [17] Finger EC, Cheng CF, Williams TR, et al. CTGF is a therapeutic target for metastatic melanoma[J]. *Oncogene*, 2014, 33(9): 1093-1100.

〔收稿日期〕 2019-02-21

〔本文编辑〕 邵碧云 崔黎明

学术快讯

上海交通大学医学院成功举办全国临床研究管理及学术论坛

2019年11月30日,由上海交通大学医学院主办,医管处和临床研究中心承办的全国临床研究管理及学术论坛在懿德楼三楼报告厅举行。来自国家科技部、卫健委,上海市卫健委、申康医院发展中心,以及全国高校、医院、临床研究机构的领导与专家学者汇聚一堂,围绕促进临床研究管理与学术交流、推进全国临床研究发展展开了讨论和交流。

医学院副院长江帆从高校临床医学学科建设角度介绍了临床研究体系建设的交医理念与实践。“以人才队伍建设为核心,以平台为支撑,辅以项目引导”,即在医学院“双百人”计划、医学院-附属医院两层级临床研究中心体系平台支撑高质量多中心临床研究项目开展;经过5年建设,开展临床科研已在医学院蔚然成风,涌现一批高水平的临床研究项目与方法学成果,也使临床研究促转化学科发展呈新貌。

此次论坛为加强国内临床研究成果转化以及管理体系建设打造了良好的交流平台,推动了国内高质量临床研究深入开展。众位资深专家在报告中提及要从临床实际问题出发开展临床研究,不忘初心,最终要将高质量的临床研究成果落实在人民健康服务中。

