

大鼠原代肝星状细胞活化过程中 CCN 家族表达研究

张艳军¹,董育红¹,李遂焰^{1*},陈渝萍^{2*}¹西南交通大学生命科学与工程学院;²西南交通大学材料科学与工程学院,成都 610031

摘要:肝纤维化是肝脏损伤后的病理性修复反应,其特征是肝脏中肝星状细胞(HSC)激活、扩增和细胞外基质蛋白过度沉积。CCN 蛋白因子是具信号传递功能的细胞基质蛋白,参与组织修复反应并涉及肝纤维化发生发展。本文制备了高纯度的大鼠原代 HSC 并通过体外培养进行激活,同步定量分析了 6 个 CCN 因子在激活过程中的表达,以期对 CCN 因子在 HSC 激活过程中的作用进行更全面的评价。

关键词:CCN 家族;肝星状细胞 HSC;肝纤维化

中图分类号:Q786

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.004

Expression of CCN Family during Rat Primary Hepatic Stellate Cells Activation

ZHANG Yan-jun¹, DONG Yu-hong¹, LI Sui-yan^{1*}, CHEN Yu-ping^{2*}¹School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University;²School of Materials

Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Abstract: Liver fibrosis is the pathological repair response of liver to injury and characteristic of activation and expanding of hepatic stellate cells (HSC) and excessive accumulation of extracellular matrix proteins (ECM) in liver. CCN factors are the signaling matricellular protein, involving in tissue repair and fibrogenesis. In this study, the highly pure primary rat HSC was isolated and cultured for their transition into the myofibroblastic phenotype. These cultured HSCs were daily collected and characterized for the MF phenotypic features, and then mRNA expression of all CCNs genes within these transiting HSCs were analyzed with the real time QRT-PCR for a full assessment of the roles of CCNs during HSC trans-differentiation.

Key words: CCN family; hepatic stellate cell; hepatic fibrosis

肝纤维化 (hepatic fibrosis) 是多种慢性肝损伤导致的病理性修复反应,其特征在于肝脏内肌成纤维母细胞 (myofibroblast, MFB) 大量扩增和其带来的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白过度沉积。肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 是位于肝血窦内富含维生素 A 的间充质细胞,在正常肝脏内处于不分裂的静息态。损伤引起肝脏内多种炎症因子分泌,可激活 HSC 转变为快速增殖的、大量分泌胶原蛋白纤维等 ECM 蛋白的 MFB,从而导致 ECM 在肝脏中异常沉积,进而引起肝纤维化。

CCN 家族是一种具有半胱氨酸富集特性的调控性的细胞基质蛋白,包括 CCN1-6 在内的六个成员,具有广泛的生物学功能^[1,2]。它们通过和细胞表面的各种整合素直接结合、或者和多种细胞生长

因子相互作用来调控各些因子的生物活性,还可通过信号途径相互作用来改变细胞生长因子的具体作用^[3]。研究表明 CCNs 影响细胞生长、分化、粘附和运动,参与胚胎发育、血管生成、伤口修复、纤维病变、炎性病变、肿瘤生长和骨的形成和修复等多种生物学过程^[4]。早在 1998 年,CCN2 就被 Tamatani 发现在胆道闭锁病人肝脏中表达增高^[5],进而被认定是判断肝纤维化的血清指标^[6]。随后又相继发现 CCN1-5 都在肝纤维化发生过程中起着重要作用^[7-10]。近年来,人们开始探索 CCNs 在调控肝纤维化中的作用机制、尤其是它们在 HSC 激活中的作用。先后有报道 CCN1-5 在 HSC 活化过程中的表达均呈现上调的趋势^[8-12],其中 CCN2 可为 TGF- β 1 诱导上调其表达并与后者协同作用、显著增强 HSC 的激活表型,被认为是 HSC 表型转化的中心通路。同 CCN2 促 MF-HSC 表型作用类似,CCN4 可提高 MF-HSC 存活、具有促进纤维化的调控作用。相反,CCN1 则被发现可诱导 MF-HSC 凋亡而表现出抑制

收稿日期:2017-02-21 接受日期:2017-03-30

基金项目:国家自然科学基金(81371675)

*通信作者 E-mail: lisuiyan@home.swjtu.edu.cn; yupingc@home.swjtu.edu.cn

纤维化作用;而 CCN3 和 CCN5 一起,减轻 CCN2 和 CCN4 的促进纤维化作用,共同抑制 HSC 增殖和 TGF- β 诱导的 HSC 从静息态到活化态的转分化。

值得注意的是,CCN 因子在特定生理过程中的具体调控作用取决于它们自身和其它多种因素的协同作用^[13]。由于可同多种潜在的蛋白结合、进而与多种生理过程关键调控成分相关联,特定 CCN 因子在不同情形下(如不同组织、不同细胞、乃至不同细胞间微环境)的作用差异很大,而其最终的调控结果常常因具体的微环境而改变,是由多个 CCN 因子共同作用而定^[14]。鉴于此,我们分离了高纯度的原代 HSC 并通过体外 7 天培养得到 MF-HSC,全面检测 6 个 CCN 因子在 HSC 活化过程中的 mRNA 表达水平,以期对 CCN 家族在 HSC 转分化过程中的共同调节作用进行探索。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂

Hyclone 细胞培养试剂(包括 PBS、培养基、胰酶和抗生素等)购自 ThermoFisher(美国);链霉菌蛋白酶(Pronase E)、IV 型胶原酶(Collagenase D)、DNA 酶 I(DNase I)和相关原代细胞分离试剂(Histodenz、HEPES、戊巴比妥钠)来自 Sigma-Aldrich(美国);胎牛血清 FBS 购自 Gibco(美国);Trizol 试剂、逆转录试剂盒和 RNase-free DNase I 购自 ThermoFisher(美国),定量 PCR 试剂来自 Bio-Rad(美国),基因引物于上海生工合成;免疫分析试剂包括 DAPI、RIPA 和蛋白酶抑制剂(Sigma-Aldrich,美国)、兔 IgG(Santa Cruz,美国)和 α -SMA 的兔抗(Abcam,美国)及 AL-EXA FLUOR 594 羊抗兔二抗购自 Invitrogen(美国)。其它常规化学试剂购自 Vetec(Sigma-Aldrich,美国)。

1.1.2 实验仪器

微型蠕动泵(兰格恒流泵有限公司),Sorvall ST 16R(Thermo Fisher,美国),微量台式离心机(Thermo Fisher,美国),细胞培养箱(Thermo Forma,美国);倒置显微镜(LEICA DMIL,美国);荧光显微照相设备(Leica,美国);实时定量 PCR 仪(CFX96, Bio-Rad,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 原代 HSC 的分离

SPF 级别、体重 400 ~ 450 g 的 SD 雄性大鼠购

自四川省人民医院实验动物研究所[实验动物生产许可证号 SCXK(川)2013-15,使用许可证号 SYXK(川)2013-058]。原代 HSC 细胞分离相关的溶液配制和操作方法均参考 Patrick 等的实验方法^[15]。

动物麻醉后,首先通过灌注进行原位肝组织消化。从门静脉依次向肝脏灌注 SC-1 溶液(至肝脏完全变白)、链霉菌蛋白酶液(约 10 ~ 15 min)和 IV 型胶原酶液(15 ~ 20 min),流速 10 mL/min,灌流液维持 37 °C。随后摘离肝脏,在超净工作台内切碎,转入盛有链霉菌蛋白酶、IV 型胶原酶和 DNA 酶 I 的消化液中,于 37 °C 水浴摇床振荡持续消化 15 min,获得肝脏细胞悬液。细胞经 120 目无菌纱布过滤,以 1700 rpm,4 °C 离心 8 min 沉淀,再用 GBSSB 溶液重悬、离心清洗后,重新悬浮于含 DNA 酶 I 的 GBSS-B 缓冲液、并加入 Histodenz 分离液进行混合。将上述含 8.48% Histodenz 的细胞悬浮液移至 15 mL 离心管内(12 mL/每管),随后在其液层上表面缓慢加入 3 mL 的 PBS 溶液,在 4 °C 下以 2500 rpm(无刹车)离心 17 min,进行第一次梯度离心。离心后观察,在 PBS 溶液层下约 12 mL 刻度左右可见一层白色细胞层。收集离心管刻度 12 mL 至 7 mL 的细胞悬液,以 PBS 清洗,再按照第一次梯度离心操作进行二次离心。离心后在 PBS 溶液层下,约 12 mL 刻度左右处可见一层清晰的白色细胞带层,此为富含维生素 A 的未活化的 HSC 细胞层。小心收集该细胞层、以 PBS 清洗并重悬于含 20% FBS 的 DMEM 高糖培养基,计数后接种于培养板进行常规细胞培养。

1.2.2 细胞的培养和观察

大鼠 HSC-T6 细胞株购自上海复祥生物科技有限公司,采用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基、于 5% CO₂、饱和湿度的 37 °C 细胞培养箱中进行常规细胞培养。在倒置相差显微镜下进行细胞增殖和形态的观察

取台盼蓝染色的 HSC 置于血细胞计数板,镜下观察并计数死细胞(仅死细胞被染色呈蓝色)和活细胞,进而计算所分离获得的原代 HSC 的细胞活力。

为考察细胞的自发荧光,取分离培养 6h 后的肝星状细胞、于荧光显微镜 328 nm(紫色滤光片下)激发光下观察,并于放大 100 倍倍数下拍照。

1.2.3 原代 HSC 和 T6 细胞的 RNA 相关操作

PBS 漂洗后的细胞以 Trizol 进行裂解,提取总 RNA;RNA 定量后以逆转录试剂盒进行逆转录、制备 cDNA 第一链;随后进行实时定量 PCR 反应,分

析肝星状细胞 MF 表型相关基因和 CCNs 家族基因的 RNA 表达水平。基因特异引物信息如下:

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primer

基因 Gene	基因符号 Gene symbol	引物的序列(5'-3') Sequence of primer (5'-3')
Cysteine-rich 61	CCN1	GGATCTGTGAAGTGCCTCCT CTGCATTTCTTGCCTTTTT
Connective tissue growth factor	CCN2	GTGCACTGCCAAAGATGGTG ACTGCTCACAGCATTTCGCCG
Nephroblastoma overexpressed	CCN3	TCTGAGATGAGACCCTGCCGA CTCCCTCTGGAACCATGCAA
Wnt-induced secreted proteins-1	CCN4/WISP1	ACCTGTATTGATGGCACCCGT TCATACCGTTGCTCCACTGC
Wnt-induced secreted proteins-2	CCN5/WISP2	CACCAACTTTCTGCCCTTGT ATCTCCAGTTGGCAGAATCG
Wnt-induced secreted proteins-3	CCN6/WIPS3	ACACGCCTAGTACGAGACA TGGGAGATTCTATAAGCTGACATT
collagen type I alpha 1	Collagen1a1	TTCCCTGGACCTAAGGGTACT TTGAGCTCCAGCTTCGCC
α -SMA	Acta2	GTGGGGGACGAAGCCGAGAG GGCCTTAGGGTTCAGCGGCC
Ribosomal protein S9	Rps9	GACTCCGGAACAAACGTGAGGT CTTCATCTTGCCTCGTCCA

1.2.4 HSC 的 ICC(细胞免疫荧光)

取培养 7 d 的原代 HSC,以 4% PFA 于室温固定 20min,-20 °C 预冷甲醇透膜 10 min,然后用封闭液(1% BSA,4% 羊血清,0.1% Tween20,0.1M 甘氨酸)在室温封闭 45 min。分别加入 α -SMA 一抗(1:500)和相应等量的正常兔 IgG、在 4 °C 孵育过夜,然后再和 ALEXA FLUOR 594 偶联的羊抗兔二抗(1:

1000)于室温避光孵育 1 h。每一步孵育前样品均以 PBS 漂洗三遍。最后以 DAPI 染核,并于荧光显微镜下进行观察,于放大 200 倍倍数下拍照。

1.3 统计学分析

方差分析采用 SPSS13.0 软件,多组间均数比较采用方差分析,组内均值分析采用 LSD-t 检验。

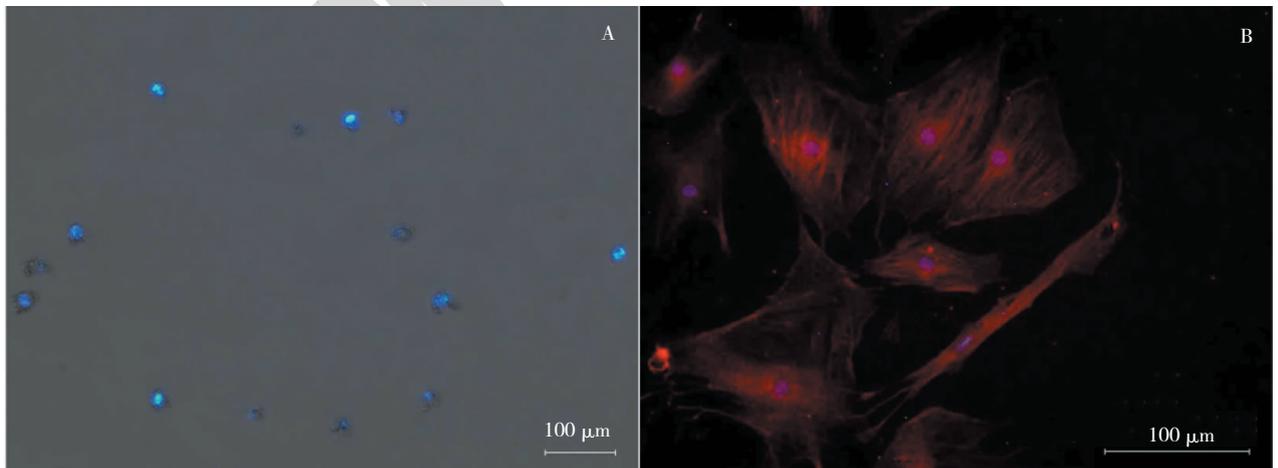


图 1 静息态和活化态肝星状细胞的鉴定

Fig. 1 Characterization of the prepared quiescent and active HSCs

注:A:静息态 HSC 的自发荧光观察;B: α -SMA 蛋白的细胞免疫荧光检测

Note:(A) Rat HSCs exhibited blue-green autofluorescence when excited by ultraviolet light at 328 nm;(B) Immunocytochemistry assay of α -SMA with the prepared HSCs.

2 结果分析

2.1 原代 HSC 的分离培养和激活

对分离得到的静息态 HSC 进行台盼蓝染色并计数活细胞,证实我们制备的 HSC 存活率超过 95%。图 1A 显示了分离 6 h 后的 HSC 细胞中维生素 A 脂滴的蓝绿色荧光,表明我们成功制备了静息态 HSC。图 1B 则显示了在体外培养 7 d 的 HSC 中,遍布着 α -SMA 蛋白纤维,充分表明此时的 HSC 已经转变成完全的 MF-HSC。

2.2 原代肝星状细胞活化过程中 CCN 家族基因的表达分析

随后,我们利用定量 RT-PCR,对各个 CCN 因子

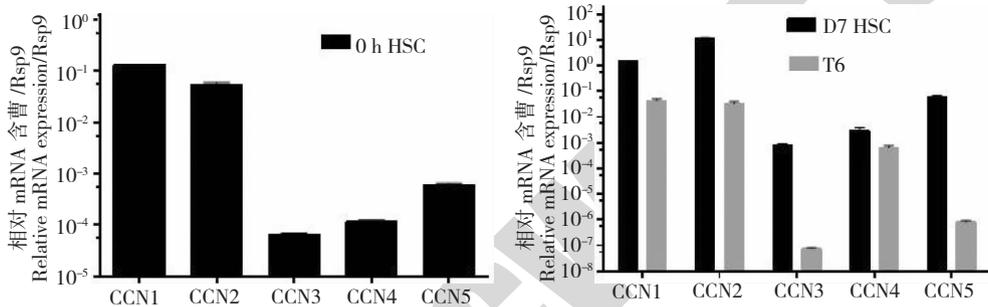


图2 CCN 家族在原代肝星状细胞和 T6 细胞中的表达分析

Fig. 2 mRNA expression of CCN family in primary HSCs and T6 cells

随后我们进一步同步分析了在 HSC 从静息态向 MF 表型转变过程中 CCN 因子的 mRNA 表达水平的改变情形。图 3 显示的是可检测到的五个 CCN 因子和 MF 表型分子标记基因在 HSC 活化过程中每天的表达改变情形。相较于预期的 MF 表型分子标记基因(α -SMA 和 Collagen1a1)的 mRNA 水平持续而显著增高的变化趋势,可检测到的五个 CCN 因子在 HSC 活化过程中每天的表达则展现出水平增高的一致性和水平改变时序的差异性:随着细胞从静息态到活化态的表型转变,所有 5 个因子的表达都显著升高。其中,CCN1 和 CCN2 的表达在激活早期(2 d)就开始明显上调,在后期达到一定平衡,不再持续升高。相反,CCN3 和 4 的表达增加开始于培养后期(培养 4 d 后),并维持上调的趋势,在第七天分别达到分离初期的 15 倍和 55 倍。从培养第三天开始 CCN5 的表达开始持续性上调;到第 7 d,已经升高超过 100 倍,是培养后期主要的表达上调的 CCN 因子。所有 CCN 因子中,CCN2 的增高幅度最大,达到 200 多倍,是整个 HSC 激活过程中上

在原代静息态 HSC、MF-HSC 和激活型的 HSC 细胞株 T6 中的表达水平进行了比较。如图 2A 所示,静息态 HSC 中丰度最高的是 CCN1 和 2,随后是 CCN5,而 CCN3 和 5 的丰度偏低,说明在静息态 HSC 中纤维化抑制性 CCN 的表达占据主导地位。在原代 MF-HSC 中,CCN2 取代 CCN1 表达最高,其 mRNA 水平甚至超过 T6 细胞;另一个促纤维化的 CCN4 的表达量也显著提高并接近 CCN5(图 2B)。有意思的是 CCN1 在原代 MF-HSC 和 T6 中都维持较高的表达水平,而 CCN5 在原代 MF-HSC 中的 mRNA 量已经非常接近 CCN1,但在 T6 细胞中却未能被检测到。另外,CCN3 的表达一直保持相对其它 CCN 较低的水平,而 CCN6 我们则未能检测到其 mRNA 信号。

调最显著的 CCN 因子。

3 讨论

CCN 蛋白可与多种蛋白因子相互作用^[16]。近年来研究者注意到,在不同细胞里、不同细胞环境下和不同生理过程中,单个 CCN 因子的作用差异很大、甚至截然不同;而且,CCN 因子间相互影响和作用、共同确定最后的调控效果^[17,18]。因此,在研发针对单一 CCN 因子的靶向性治疗时,必须考虑 CCN 因子间和具体的作用环境及对象。CCN 因子作为单个调控因子参与肝纤维化的发生发展已经引起关注^[19],在 HSC 活化过程中的表达分析也陆续有人报道^[8-12]。但是,尚未见在 HSC 转分化过程中对所有 CCN 因子的表达进行平行分析和比较的报道。本文采用定量实时 RT-PCR,对 HSC 从静息态向 MF 表型转变过程中 6 个 CCN 蛋白因子的基因表达进行同步检测。据我们所知,这是第一次对 HSC 活化过程所有 CCN 因子的表达进行同步评价的研究。

我们发现,CCN1-5 因子的表达随 HSC 的激活

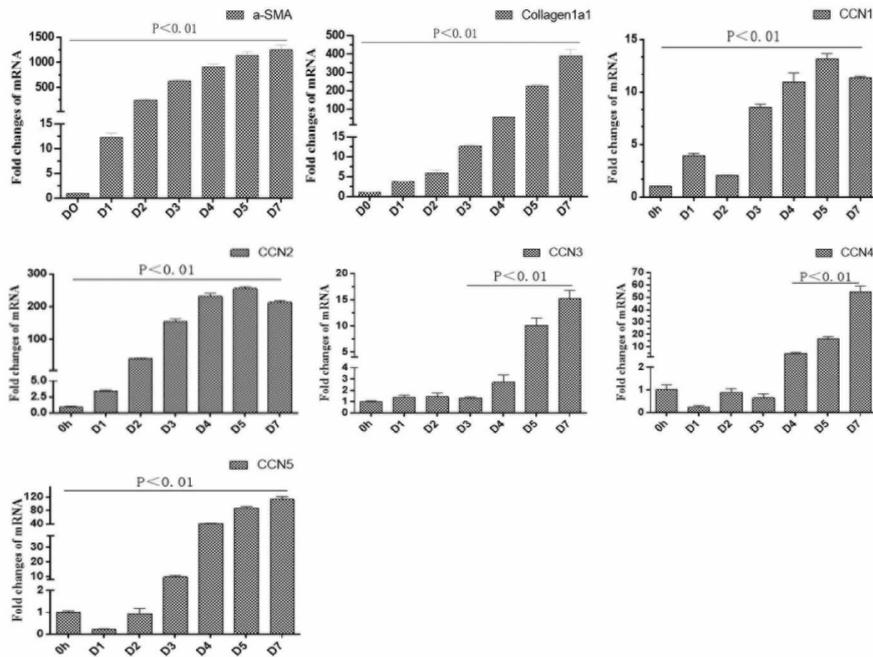


图3 MF表型相关基因和CCN家族在肝星状细胞活化过程中的表达

Fig. 3 mRNA expression profiles of the MF-HSC marker genes and CCN family during activation of HSCs

均增强,和文献报道结果一致^[8-12]。尤其是CCN2的表达增强不仅发生早、且幅度最大,充分表明它主导了HSC向MF表型的转变。作为TGF- β 在成纤维细胞中特异的下游靶基因,CCN2和TGF- β 可一起促进HSC的MF表型产生。另外,CCN4的表达在七天培养的HSC中有近40倍的增加,这个增长速度超过已报道的几倍增长^[20],且其表达在培养后期快速增长,在更长的培养时间内维持这一增长趋势,表明该因子可能协同CCN2一起推进MF表型的获得和维持。

有意思的是,张承彦等人发现LX-2细胞中TGF- β 可诱导CCN2表达增高、但对CCN5并无作用^[21]。因此,我们在原代HSC在活化过程中较晚阶段的所观察到的CCN5表达的强势增强可能来自其它信号因子的诱导。由于CCN5在LX-2曾展示出抑制TGF- β 信号途径、拮抗CCN2的促纤维化作用,原代HSC培养后期时所观察到的CCN5的高表达,可能有平衡CCN2的功能。

CCN1是静息态HSC中表达量最高的因子,我们推测它可能参与对静息表型的维持。在培养中期CCN1表达增强、并在MF-HSC中保持仅次于CCN2的高水平。这一结果和Borkham-Kamphorst的报道一致^[8],显示该因子在MF-HSC中仍然发挥一定作

用。Kim和Borkham-Kamphorst等人的研究均显示该因子可诱导活化HSC的衰老、凋亡和TGF- β ^[7,22,23],意味着在HSC的转分化过程中伴随着细胞的衰老、凋亡和对活化负方向的调控。CCN3也具有抑制MF表型^[9]和诱导细胞凋亡的作用,在肾纤维化的研究中发现其下调TGF- β 对CCN2的诱导^[24]。但是我们注意到其表达量在HSC的活化前后都很低,推测它的作用可能受到其它CCN因子的控制。有研究表明,CCN6可刺激肺成纤维细胞的增殖、具有促纤维化的作用^[25]。但在静息态和活化态HSC中,我们并没有检测到CCN6的表达;在MF-HSC细胞株T6中也未能观察到。这些结果表明该因子可能不参与HSC的激活。

综上所述,在HSC表型转变的过程中,CCN家族总体上均表现出表达增强趋势,但每个CCN因子的表达具有时空特异性,在HSC活化的不同阶段,CCN家族成员之间的表达存在差异,表明CCN因子在参与HSC转分化的调控中相互拮抗、相互协同,共同作用,但具体的作用机制尚待进一步研究。

参考文献

- 1 Timothy P, George P, Sanders YL, *et al.* Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Molecul Cell Biol*, 1990, 10: 3569-3577.

- 2 Joliot C, Martinerie G, Dambrine, *et al.* Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Molecul Cellul Biol*, 1992, 12:10-21.
- 3 Jun J, Lau LF. Taking aim at the extracellular matrix; CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10:945-963.
- 4 Perbal B. CCN proteins: A centralized communication network. *J Cell Commun Signal*, 2013, 7:169-177.
- 5 Tamatani T. Establishment of the enzyme-linked immunosorbent assay for connective tissue growth factor (CTGF) and its detection in the sera of Biliary Atresia. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251:748-752.
- 6 Gressner M, Yagmur E, Lahme B, *et al.* Connective tissue growth factor in serum as a new candidate test for assessment of hepatic fibrosis. *Clin Chem*, 2006, 52:1815-1817.
- 7 Kim KH, Chen CC, Monzon RI, *et al.* Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Molecul Cellul Biol*, 2013, 33:2078-2090.
- 8 Borkham-Kamphorst E, Schaffrath C, Weiskirchen R, *et al.* The anti-fibrosis effects of CCN1/CYR61 in primary portal myofibroblasts are mediated through induction of reactive oxygen species resulting in cellular senescence, apoptosis and attenuated TGF- β signaling. *Biochem Biophys Acta*, 2014, 1843:902-914.
- 9 Borkham-Kamphorst E, Claudia R, Leur VE, *et al.* CCN3/NOV small interfering RNA enhances fibrogenic gene expression in primary hepatic stellate cells and cirrhotic fat storing cell line CFSC. *J Cell Commun Signal*, 2012, 6(1):11-25.
- 10 Jia Q, Dong Q, Qin L. CCN: core regulatory proteins in the microenvironment that affect the metastasis of hepatocellular carcinoma? *Oncotarget*, 2016, 7:1203-1214.
- 11 Wu QF, Marda J, Song J, *et al.* Members of the Cyr61/CTGF/NOV protein family: emerging players in hepatic progenitor cell activation and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Gastroenterol Res Prac*, 2016, 2016:1-9.
- 12 Huang GC, David RB. Integrin expression and function in the response of primary culture hepatic stellate cells to connective tissue growth factor (CCN2). *J Cell Mol Med*, 2011, 15:1087-1095.
- 13 Yeger H, Perbal B. CCN family of proteins: critical modulators of the tumor cell microenvironment. *J Cell Commun Signal*, 2016, 10:229-240.
- 14 Hara C, Kubota S, Nishida T, *et al.* Involvement of multiple CCN family members in platelets that support regeneration of joint tissues. *Modern Rheumatol*, 2016, 21:1-10.
- 15 Patrick M, Melanie F, Florian W. Seven step to hepatic stellate cells. *J Visual Exp*, 2011, 51:1-5.
- 16 Perbal B. CCN proteins: multifunctional signaling regulators. *Lancet*, 2004, 363(9402):62-64.
- 17 Roeyen RC, Boor P, Erawan BK, *et al.* A novel, dual role of CCN3 in experimental glomerulonephritis pro-angiogenic and antiangioproliferative effects. *Am J Pathol*, 2012, 180:1979-1990.
- 18 Borkham-Kamphorst E, Steffen BT, Weiskirchen R, *et al.* Adenoviral CCN gene transfers induce *in vitro* and *in vivo* endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *Biochem Biophys Acta*, 2016, 1863:2604-2612.
- 19 Zhang CY (张承彦). Advances of the CCN family in fibrosis. *Basic Clin Med* (基础医学与临床), 2014, 34:410-413.
- 20 Jian YC, Wang JJ, Dong S, *et al.* Wnt-induced secreted protein 1/CCN4 in liver fibrosis both *in vitro* and *in vivo*. *Clin Lab*, 2014, 60:29-35.
- 21 Zhang CY (张承彦), Xie X (谢鑫), Gao DS (高登升), *et al.* Effects of CCN5 overexpression on the expression of α -SMA and Collagen I in hepatic stellate cells and its mechanism. *Chin J Appl Physiol* (中国应用生理学杂志), 2013, 29:411-415.
- 22 Borkham-Kamphorst E, Schaffrath C, Weiskirchen R, *et al.* The anti-fibrosis effects of CCN1/CYR61 in primary portal myofibroblasts are mediated through induction of reactive oxygen species resulting in cellular senescence, apoptosis and attenuated TGF- β signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843:902-914.
- 23 Borkham-Kamphorst E, Steffen BT, Weiskirchen R, *et al.* CCN1/CYR61 overexpression in hepatic stellate cells induces ER stress-related apoptosis. *Cellul Signal*, 2016, 28:34-42.
- 24 Riser BL, Najmabadi F, Riser SC, *et al.* CCN3 (NOC) is a negative regulator of CCN2 (CTGF) and a novel endogenous inhibitor of the fibrotic pathway in an *in vitro* model of renal disease. *Am J Pathol*, 2009, 174:1725-1734.
- 25 Batmunkh R, Nishioka Y, Azuma M, *et al.* CCN6 as a profibrotic mediator that stimulates the proliferation of lung fibroblasts via the integrin 1/focal adhesion kinase pathway. *J Med Invest*, 2011, 58(3-4):188-196.