

TGF- β 1 和 CTGF 在大鼠高动力性肺动脉高压模型中的表达及意义 *

朱 蓉 张艳玲[△] 冉 珂 于 蓉 陈章玲

(中南大学湘雅二医院麻醉科 湖南长沙 410011)

摘要 目的:研究大鼠高动力性肺动脉高压模型转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)和结缔组织生长因子(connective tissue growing factor, CTGF)的表达变化及意义。方法:45只SD大鼠随机分成左肺全切组(A)、假手术组(B)和对照组(C),每组15只。手术后6周测各组大鼠肺动脉平均压(mPAP)、右心室肥厚指数(RVH)、光镜下检测肺肌型小动脉占肺小血管百分比(SMA%)。免疫组化观察TGF- β 1和CTGF在肺组织中的表达,RT-PCR检测肺组织TGF- β 1mRNA和CTGF mRNA的表达水平。结果:①左肺全切后复制了高动力性肺动脉高压模型,引起mPAP、RVH和SMA%明显增高($P < 0.05$)。②左肺全切组TGF- β 1和CTGF蛋白及mRNA表达均较假手术组和对照组显著性增加($P < 0.05$)。而假手术组和对照组之间各指标没有显著性差异。结论:TGF- β 1和CTGF的过度表达是高动力性肺动脉高压发生发展的重要因素,可能共同促进了肺血管重构。

关键词 转化生长因子- β 1 结缔组织生长因子 肺动脉高压 大鼠

中图分类号:Q95-3 R543.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)01-12-04

Expression and Implication of TGF- β 1 and CTGF in the Hemodynamic Pulmonary Hypertension in Rats*

ZHU Rong, ZHANG Yan-ling[△], RAN Ke, YU Rong, CHEN Zhang-ling

(Department of Anesthesiology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and connective tissue growth factor (CTGF) in lung tissues of rats with hemodynamic pulmonary hypertension. **Methods:** Forty-five SD rats were randomly divided into group A(total resection of left lung), group B(sham operated)and group C (control), with 15 rats in each group. Six weeks later, the mean pulmonary artery pressure (mPAP) and index of right ventricle hypertrophy (RVH) of every group were measured. The percentage of small pulmonary muscularized arteries to all the small pulmonary vessels (SMA%) were observed and calculated under optical microscope. Immunohistochemistry methods were performed to determine TGF- β 1 and CTGF protein expression in lung tissue. The expressions of TGF- β 1 mRNA and CTGF mRNA in lung tissue were evaluated by RT-PCR. **Results:** ① The animal model of hemodynamic pulmonary hypertension was confirmed by increased mPAP, index of RVH and SMA% in total resection of left lung group. ② Compared with sham operated group and control group, the expression of protein and mRNA of TGF- β 1 and CTGF were significantly increased in total resection of left lung group ($P < 0.05$). But there was no difference in each index between the sham operated group and control group. **Conclusion:** The TGF- β 1 and CTGF are important factors in the development of hemodynamic pulmonary hypertension, and may co-play an important role in the pulmonary artery remodeling.

Key words: Transforming growth factor- β 1; Connective tissue growth factor; Pulmonary hypertension; Rat

Chinese Library Classification: Q95-3, R543.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)01-12-04

前言

高动力性肺动脉高压(hemodynamic pulmonary hypertension, PH)是左向右分流型先天性心脏病最常见和较严重的并发症之一,其严重程度直接影响疾病的转归和手术效果。因此,深入探讨肺动脉高压发病机理具有重要的理论和实际意义。肺血管重构、肺血管收缩反应性增强、肺循环凝血机制改变是PH发生发展的重要病理生理基础,其中,肺血管重构(pulmonary vascular structural remodeling, PVSR)是中心环节^[1]。转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)和结缔组织

生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是肺血管重构病理进程中的关键因子,对肺动脉平滑肌细胞增殖和细胞外基质沉积起着重要调节作用^[2-4]。为此,本研究应用左肺切除术建立大鼠高动力性肺动脉高压模型,观察肺组织TGF- β 1和CTGF的变化,探讨二者在PH中的作用和意义。

1 材料与方法

1.1 实验分组和动物模型的建立

雄性SPF级9周龄S-D大鼠45只(中南大学湘雅二医院实验动物中心提供),体重约250g。随机分为左肺全切组A

* 基金项目 湖南省自然科学基金(11JJ6075)

作者简介 朱蓉(1976-),女,博士,主治医师,主要研究方向:心血管疾病, E-mail:zhurong0807@hotmail.com

[△]通讯作者 张艳玲,电话:0731-85295970 E-mail:zhurong0807@hotmail.com。

(收稿日期:2011-10-08 接受日期:2011-10-31)

(n=15)、假手术组 B (n=15)和对照组 C (n=15)。左肺全切组大鼠根据文献^[5]行左肺切除术：腹腔注射 10%水合氯醛(0.2-0.4ml/100g)麻醉后,气管插管,呼吸机支持(潮气量 5ml·kg⁻¹,呼吸频率 80 次·min⁻¹)。取右侧卧位,经左侧第 4 肋间后外侧切口进胸,依次切除左肺上、中、下叶。查无渗血无漏气后逐层关胸。术后呼吸机支持 45min,待大鼠神智清楚,呼吸有力,拔除气管导管。假手术组大鼠仅做左侧开胸,不做肺叶切除术。两组大鼠术后均给予腹腔注射青霉素抗炎。术后均饲养 6 周。

1.2 肺动脉压力测定

至观察终点后,以上动物腹腔注射 10%水合氯醛(0.2-0.4ml/100g)麻醉,经颈正中切口,行气管切开,插入 16 号套管针,接动物呼吸机,潮气量 4ml·kg⁻¹、频率 80 次·min⁻¹。沿两侧肋骨打开胸腔,经右心室穿刺至肺动脉主干,接压力传感器测肺动脉平均压(m PAP)。

1.3 右心室肥厚指数测定

实验完毕放血处死动物后,游离心脏,切去心房,分离右心室(RV)和左心室加室间隔(LV+S)。滤纸吸干水分后分别称重,计算右心室肥厚指数(RV/LV+S)。

1.4 肺组织的处理

右肺用生理盐水通过肺动脉冲洗剩余的血液,立即取右下肺组织放入液氮中冷冻保存用于 RT-PCR。用 10%中性甲醛在 20cmH₂O 压力下低压灌注固定右上肺,使肺表面平滑膨胀,约 5 min 后切取右上肺,于 10%中性甲醛液中固定 48 h,沿肺门横断取材,石蜡包埋、4μm 连续切片,进行 Masson 染色和 TGF-β1 及 CTGF 免疫组织化学染色。

1.5 肺血管显微形态学指标的检测

每只大鼠选一张 Masson 染色切片,光镜下观察肺血管形态,应用 Leica Qwin 电脑图像处理系统(德国 Leica 公司)检测并计算肺肌型小动脉占肺小血管(外径≤ 50μm,无论是否具有完整的内外弹力层)总数的百分比(SMA%)。每只大鼠计数 5 个视野,取 SMA%均值。

1.6 免疫组化 SP 法检测 TGF-β1 和 CTGF 在肺组织中的蛋白表达

SP 试剂盒为美国 Zymed 公司产品。石蜡切片经脱蜡至水、酶消化、山羊血清封闭孵育、滴加一抗和二抗(一抗分别为兔抗大鼠 TGF-β1 和 CTGF 多克隆抗体,1:200,北京中杉金桥生物

制品公司;二抗为生物素化的羊抗兔即用型)、DAB 显色及苏木精复染等步骤后,采用彩色图像分析系统进行定量分析。每张切片随机选取 5 个视野,取平均阳性面积百分比(%) ,进行统计学分析。用 PBS 替换一抗作阴性对照。

1.7 RT-PCR 法检测 TGF-β1 mRNA 和 CTGF mRNA 表达

1.7.1 引物设计 从 NCBI 基因数据库中下载大鼠 TGF-β1、CTGF 和内参 GAPDH 基因 cDNA 序列,运用 Primer premier 5.0 引物设计软件设计 PCR 扩增引物序列。大鼠 TGF -β1 上游和下游引物分别 5'- CCTGCACAGCTCCAGGCACC -3' 和 5'- ATGCGGAAGCACCCGGGTG -3', 产物长度 248 bp ,CTGF 上游和下游引物分别 5'- GCGCCAAGCAGCTGGGAGAA -3' 和 5'- CGGCCCCATCCAGGCAAGTG -3', 产物长度 213 bp ;内参照 GAPDH 上下游引物序列分别为 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3' 和 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3', 产物长度 450 bp 。引物由 Sangon 公司合成。

1.7.2 肺组织总 RNA 的抽提及逆转录聚合链反应(RT-PCR) 取大鼠右肺组织 200 mg 在液氮中充分研磨 ,Trizol 一步抽提法提取总 RNA ,紫外分光光度法测定 RNA 的浓度及纯度。逆转录 cDNA 的过程参照试剂说明书操作。PCR 反应体系 25μl ,扩增条件 :预变性 94℃ 3 min ,变性 94℃ 30s ,退火 TGF -β159℃ ,CTGF 58℃ 30s ,延伸 72℃ 45s ,30 个循环 ,72℃ 终末延伸 5 min。PCR 产物与 100bp DNA Ladder 在 1.5 %琼脂糖凝胶中电泳 ,溴化乙锭染色 ,柯达紫外 400W 成像系统观察并记录结果 ,凝胶分析软件 Gel pro 4.0 扫描目的基因与内参照 (GAPDH) 扩增条带的灰度值。以目的条带与 GAPDH 条带灰度比值衡量各样本目的基因的相对表达量。

1.8 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数± 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示 ,用 SPSS13.0 软件处理数据 ,组间比较采用单因素方差分析。检验水准α=0.05 ,P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 mPAP、RV/(LV+S)及 SMA%的变化

实验第 6 周末 ,左肺全切组 mPAP、RV/(LV+S)及 SMA% 值均较假手术组和对照组显著增高(P<0.05) ,假手术组和对照组之间上述指标无明显差异(表 1)。

表 1 各组大鼠 mPAP、RV/(LV+S)和 SMA%比较($\bar{X} \pm S$, n=15)
Table 1 Comparison of mPAP, RV/(LV+S) and SMA% in each group ($\bar{X} \pm S$, n=15)

Group	mPAP(mmHg)	RV/(LV+S)	SMA%
A	21.23± 1.66▲※	0.35± 0.02▲●	18.47±9.75▲●
B	13.24± 1.72	0.27± 0.02	11.65±7.31
C	12.56± 1.87	0.28± 0.04	11.84±5.70

Note : ※P<0.01 compared with group C; ▲P<0.05 compared with group C; ● P<0.05 compared with group B.

2.2 免疫组化染色显示肺组织中 TGF -β1 和 CTGF 的表达

免疫组化结果显示胞浆内有黄色或棕黄色的颗粒即为阳性表达部位。对照组和假手术组大鼠肺血管壁、肺间质、支气管壁等处可见 TGF-β1 和 CTGF 表达呈弱阳性,而手术组大鼠 TGF-β1 和 CTGF 在支气管上皮细胞、血管内皮细胞、炎症细胞

和纤维细胞表达均明显增强,以肺动脉血管壁最为明显(图 1 ,图 2)。左肺切除组肺组织 TGF-β1 阳性面积百分比 (3.242 ± 1.612) 明显高于对照组 (1.308± 0.649) 和假手术 (1.395± 0.544) 组,差异有统计学意义 (P<0.05)。左肺切除组肺组织 CTGF 阳性面积百分比 1.904± 0.367 ,明显高于假手术组

(0.896 ± 0.192)和对照组(0.926 ± 0.247) ,具统计学意义($P < 0.05$)。对照组和假手术组之间各指标没有明显差异(表 2)。

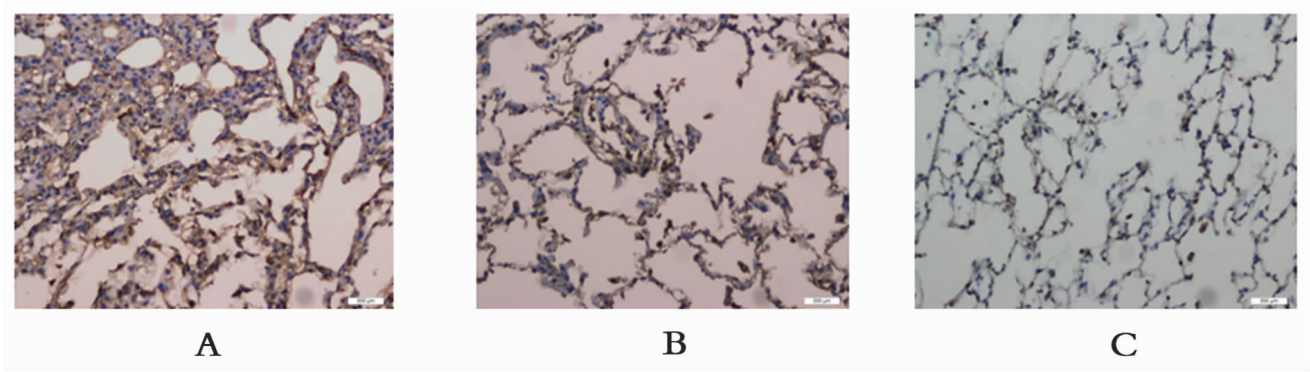


图 1 各组大鼠肺组织中 TGF-β1 分布和表达 (免疫组化染色 200×)

Fig. 1 Location and expression of TGF-β1 in lung tissue of rats (immunohistochemical staining, 200×)

A: Total resection of left lung group; B: Bham operated group; C: Control group

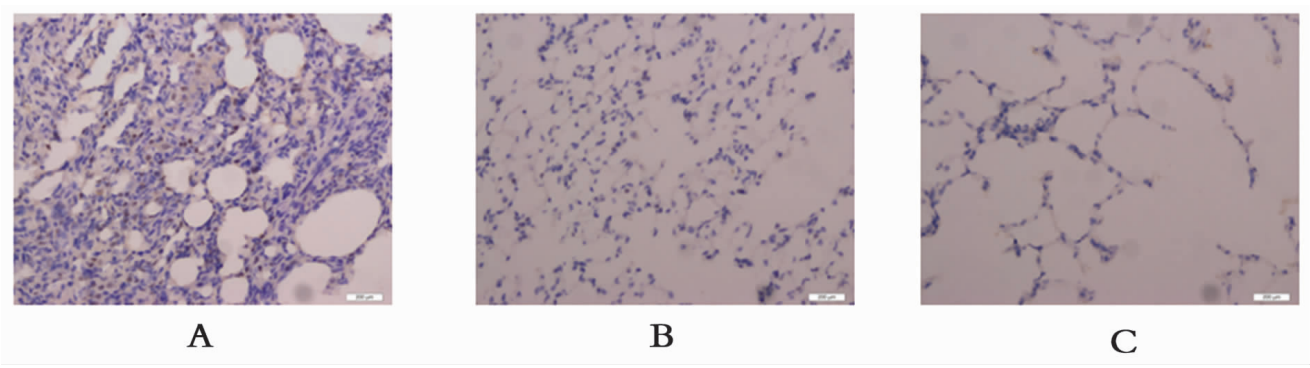


图 2 各组大鼠肺组织中 CTGF 分布和表达 (免疫组化染色 200×)

Fig. 2 Location and expression of CTGF in lung tissue of rats (immunohistochemical staining, 200×)

A: Total resection of left lung group; B: Sham operated group; C: Control group

表 2 各组大鼠 TGF-β1 和 CTGF 含量 ($\bar{X} \pm S$, n=15)

Table 2 Expression of TGF-β1 and CTGF in each group ($\bar{X} \pm S$, n=15)

Variable	A	B	C
TGF-β1	$3.242 \pm 1.612^{\blacktriangle\bullet}$	1.395 ± 0.544	1.308 ± 0.649
CTGF	$1.904 \pm 0.367^{\blacktriangle\bullet}$	0.896 ± 0.192	0.926 ± 0.247

Note : $\blacktriangle P < 0.05$ compared with C group; $\bullet P < 0.05$ compared with B group

2.3 大鼠肺组织中 TGF-β1 mRNA 和 CTGF mRNA 表达检测

左肺切除组 TGF-β1 mRNA 相对水平为 0.197 ± 0.083 ,较对照组(0.033 ± 0.011)和假手术组(0.051 ± 0.012)显著升高。CTGF mRNA 相对水平为 0.235 ± 0.134 ,亦较对照组(0.029 ± 0.008)和假手术组(0.039 ± 0.009)显著升高 ,差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 3、图 4 和表 3)。

3 讨论

本研究中 ,大鼠左肺切除术后 6 周 ,肺动脉平均压明显增高 ,SMA%和 RV/ (LV+S) 等形态学指标也明显增高 ,肺组织 Masson 染色切片可见肺小动脉管壁增厚 ,管腔狭窄等形态学改变。提示 ,手术组大鼠形成肺血管重构和右心室肥厚 ,此高动

力性肺动脉高压大鼠模型成功建立。

左向右分流型先天性心脏病常常引起肺循环血流量增加 ,灌注压升高 ,肺小动脉内皮细胞结构和功能异常 ,进而导致肺小动脉收缩痉挛和构型改变 ,肺动脉压力进行性升高。肺血管重构是高动力性肺动脉高压发展和持续的主要原因。国内外大量研究表明 ,多种细胞因子表达、分布和生物学活性的异常参与了肺血管重构的发生、发展过程 ,其中 TGF-β1 和 CTGF 发挥了重要作用。TGF-β1 主要由淋巴细胞及单核巨噬细胞合成释放 ,在肺内广泛分布于支气管上皮细胞、肺泡巨噬细胞、II 型肺泡上皮细胞及间质细胞等 ,起着调控细胞增殖、分化等作用 ,在炎症、肿瘤、自身免疫疾病和纤维化疾病中起着重要作用^[6]。研究发现 TGF-β1 是参与肺血管重构的重要介质之一。Wang 等^[7]在高肺血流 PH 模型中发现 ,TGF-β1 通过上调血管平滑肌

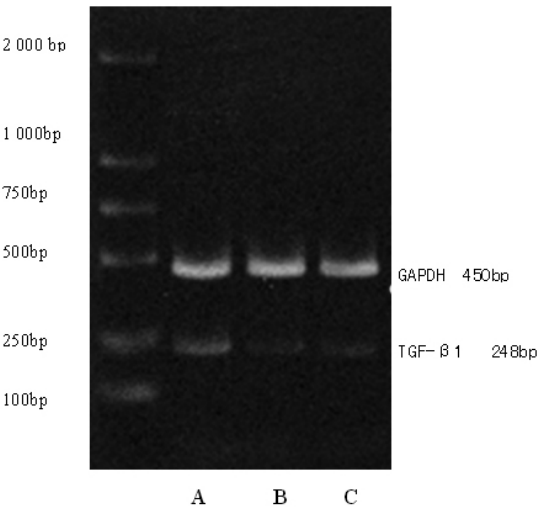


图 3 各组 TGF-β1 mRNA 的表达

Fig. 3 Expression of TGF-β1 mRNA in different groups

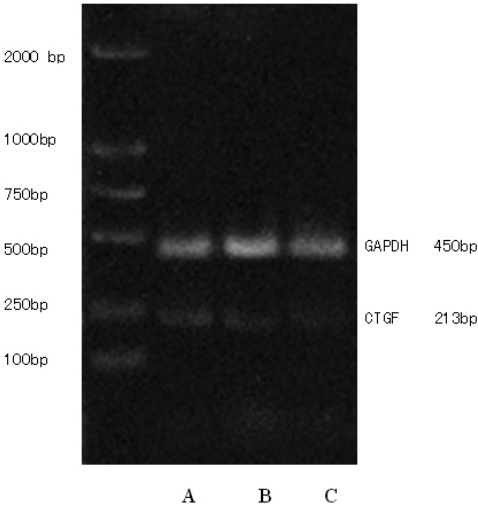


图 4 各组 CTGF mRNA 表达

Fig. 4 Expression of CTGF mRNA in different groups

表 3 各组 TGF-β1 mRNA 和 CTGF mRNA 表达同 GAPDH 的灰度比值($\bar{X} \pm S$, n=15)
Table 3 The ratio value of brightness compared between different groups($\bar{X} \pm S$, n=15)

Variable	A	B	C
TGF-β1 mRNA	0.197± 0.083 ▲●	0.051± 0.012	0.033± 0.011
CTGF mRNA	0.235± 0.134*●	0.039± 0.009	0.029± 0.008

Note : *P<0.01 compared with C group; ▲P<0.05 compared with C group; ●P<0.05 compared with B group

细胞 VEGF 的表达诱导血管生成,在中膜血管平滑肌细胞增生和 ECM 沉积中起重要作用。Mata-Greenwood 等建立的羊先天性心脏病模型中肺小血管平滑肌细胞及内皮细胞 TGF-β1 和 ALK-1 蛋白表达显著增强,肺血管明显肌化,中膜增厚。Long 等^[8]研究发现野百合碱肺动脉高压大鼠肺动脉平滑肌细胞和肺动脉旁巨噬细胞中 TGF-β1 表达升高明显。亦有报道^[9]腔-腹分流肺动脉高压大鼠模型中肺组织 TGF-β1 表达增加。体外试验亦证明,原发性 PH 患者肺动脉平滑肌细胞对 TGF-β1 反应性增强,而对骨形态发生蛋白反应减弱,导致 TGF-β1 超家族生长转导信号改变^[10]。

CTGF 是一种富含半胱氨酸的多肽,广泛分布于多种人类组织器官中,主要由肺成纤维细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞、肝星形细胞、肾小球系膜细胞等间质细胞合成分泌。体内正常分泌的 CTGF 具有促有丝分裂、趋化细胞、诱导粘附和促进 ECM 合成等生物功能^[11,12]。但是 CTGF 过度表达会导致动脉粥样硬化、器官纤维化等病理过程的发生。CTGF 的启动子中存在一个 TGF-β1 应答元件,故认为 CTGF 作为 TGF-β1 糖基化终产物的下游介质,参与了 TGF-β1 的多种生物效应^[13]。近来,CTGF 在血管重构中的作用引起重视。Shimo 等^[14]研究表明血管平滑肌细胞中过量表达的 CTGF 能够明显提高细胞的增生和迁移率,这种增生和迁移改变能够被抗-CTGF 抗体抑制。此外,过量表达的 CTGF 也明显增加基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)的活性,刺激平滑肌细胞产生大量的 I 型胶原、纤维结合蛋白等细胞外基质^[15]。本实验结果显示,左肺切除组大鼠支气管上皮细胞、血管内皮细胞、炎症细胞和纤维细胞 TGF-β1 和 CTGF 表达增强。TGF-β1mRNA 和 CTGF mRNA 在左肺切

除组较对照组和假手术组均明显增高。结果提示 TGF-β1 和 CTGF 可能是高动力性肺动脉高压发生发展过程中的重要分子介质。

综上所述,通过本实验我们发现肺动脉高压时 TGF-β1 和 CTGF 蛋白和 mRNA 在肺组织的表达增强,提示二者参与了肺高压的血管重塑及肺循环阻力增加的病理生理过程。TGF-β1 和 CTGF 在肺高压发生、发展过程中的变化规律、相互作用关系及分子机制尚需进一步研究。

参考文献(References)

[1] Schermuly RT, Wilkins MR, Ghofrani HA, et al. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension[J]. Nat Rev Cardio, 2011 Jun, 8 (8):443-455

[2] Ahmed MS, Vinge LE, von Lueder TG, et al. Induction of pulmonary connective tissue growth factor in heart failure is associated with pulmonary parenchymal and vascular remodeling [J]. Cardiovasc Res, 2007 May, 74(2): 323-333

[3] Kearley J, Erjefalt JS, Andersson C, et al. IL-9 governs allergen-induced mast cell numbers in the lung and chronic remodeling of the airways. Am J Respir Crit Care Med. 2011, 183(7):865-875

[4] Sehid C,Tueb B. Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor [J]. Exp Cell Res, 2002,274: 83-91

[5] Wu Shu, Peng Jinghong, Matthew R Duncan, et al. ALK-5 mediates endogenous and TGF- beta 1 induced express ion of CTGF in embryonic lung [J]. Am J Respir Cell Mol Biol 2007, 36(5): 552-561

[6] Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression and cellular function of transforming growth factor-beta [J]. Pharmacology &Therapeutics, 2003, 98: 257-265

(下转第 8 页)

- [3] Liu N, Wang L, Liu X, et al. Promoter methylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDRG2 expression levels in several cancer cell lines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358: 164-169
- [4] Liu N, Wang L, Li X, et al. N-Myc downstream-regulated gene 2 is involved in p53-mediated apoptosis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 5335-5349
- [5] Shon SK, Kim A, Kim JY, et al. Bone morphogenetic protein-4 induced by NDRG2 expression inhibits MMP-9 activity in breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 385: 198-203
- [6] Deng YC, Yao LB, Chau L, et al. N-Myc downstream-regulated gene2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation [J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(3): 342-347
- [7] 刘新平,邓艳春,韩炯,等. Ndr2 基因表达对胃癌细胞增殖调控及其机理的研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003,30 (1): 116-121
Liu Xin-ping, Deng Yan-chun, Han Jiong, et al. Effect of Ndr2 Gene Expression on Gastric Carcinoma Cell Proliferation [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2003,30 (1): 116-121
- [8] Lorentzen A, Vogel LK, Lewinsky RH, et al. Expression of NDRG2 is down-regulated in high-risk adenomas and colorectal carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2007,(7): 192
- [9] Hu XL, Liu XP, Lin SX, et al. NDRG2 expression and mutation in human liver and pancreatic cancers. [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10 (23): 3518-3521
- [10] 吴国强,刘新平,王立峰,等. NDRG2 对肝癌细胞 HepG2 凋亡的诱导作用[J]. *细胞与免疫学杂志*, 2003,19(4): 357-360
Wu Guo-qiang, Liu Xin-ping, Wang Li-feng, et al. Induction of apoptosis of Hep G2 cells by NDRG2 [J]. *Chin j cell mol immunol*, 2003,19(4): 357-360
- [11] Lee DC, Kang YK, Kim WH, et al. Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis. *Cancer Res*, 2008, 68: 4210-4220
- [12] Liu N, Wang L, Liu X, et al. Promoter methylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDRG2 expression levels in several cancer cell lines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007,358 (1): 164-169
- [13] Kay R, Rosten P M, Humphries R K. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor [J]. *J Immunol*, 1997, 147 (4): 1412-1416
- [14] Friedrichs J, Zeller Y, Hafezi-Moghadam A, et al. The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(23): 6714-6722
- [15] Fogel M, Friedrichs J, Zeller Y, et al. CD24 is a marker for human breast carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 1999, 143(1): 87-94
- [16] Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, et al. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin[J]. *FASEB J*, 1998, 12: 1241-1251

(上接第 15 页)

- [7] Wang XX, Zhang, FR,Shang Y, et al. Transplantation of Autologous Endothelial Progenitor Cells May Be Beneficial in Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension [J].*Journal of the American College of Cardiology*, 2007(14):1566-1571
- [8] Long L, Crosby A, Yang X, et al. Altered bone morpho-genetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor- like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease [J]. *Circulation*, 2009, 119 (4): 566-576
- [9] 王聪,刘文莉,王海英,等.内源性硫化氢抑制高肺血流大鼠肺动脉弹力蛋白的表达[J]. *基础医学与临床*, 2007, 27(12): 1329-1333
Wang Cong, Liu Wenli, Wang Haiying, et al. Endogenous hydrogen sulfide inhibits expression of elastin of pulmonary artery with high pulmonary blood flow in rats [J]. *Basic& Clinical Medicine*, 2007, 27 (12): 1329-1333
- [10] Morrell NW, Yang X, Upton PD, et al. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic proteins[J]. *Circulation*, 2001, 104(7): 790-795
- [11] Moussad E E, Brigstock D R. Connective tissue growth factor: what's in a name? [J].*Mol Genet Metab*, 2000, 71(1-2): 276-292
- [12] Kidd M, Modlin IM, Shapiro MD, et al. CTGF, intestinal stellate cells and carcinoid fibrogenesis [J].*World J Gastroenterol*, 2007, 13 (39): 5208-5216
- [13] Grotendorst GR, Lau LF, Perbal B. CCN Proteins are distinct from and should not be considered members of the insulin-like growth factor-binding protein superfamily [J].*Endocrinology*, 2000,14 (6): 2254-2256
- [14] Shimo T, Koyama E, Sugito H, et al. Retinoid signaling regulates CTGF expression in hypertrophic chondrocytes with differential involvement of MAP kinases [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20 (5): 867-877
- [15] Junglas B, Yu AH, Tamm ER, et al. Connective tissue growth factor induces extracellular matrix deposition in human trabecular meshwork cells[J]. *Exp Eye Res*, 2009, 88(6):1065-1075