

结缔组织生长因子在糖尿病视网膜病变中的调控机制及研究进展

梁曦达, 王光, 陈晓隆

作者单位: (110004) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院眼科

作者简介: 梁曦达, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 陈晓隆, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 眼底病、眼外伤. chenxl@sj-hospital.org

收稿日期: 2015-12-23 修回日期: 2016-03-07

Regulatory mechanism and research progress of connective tissue growth factor in diabetic retinopathy

Xi-Da Liang, Guang Wang, Xiao-Long Chen

Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xiao-Long Chen. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. chenxl@sj-hospital.org

Received: 2015-12-23 Accepted: 2016-03-07

Abstract

• Diabetic retinopathy is one of the microvascular abnormal diseases. In the late stage of disease progression, the antibody of vascular endothelial growth factor can significantly inhibit the formation of new blood vessels and improve macular edema, which is widely used in clinical. However, the aggravation of pro-fibrotic influence after long-term treated by the medicine also attracts a wide range of attention. Connective tissue growth factor, as an important cytokine in intraocular fibrosis, over expressed after treated by the drug, is considered to be one of the most important factors in the side effect of the drug, and is also a potential therapeutic target. After finishing the current research, the regulation mechanism of connective tissue growth factor, includes two ways, regulation of gene expression and direct binding to other cell factors or receptors. Because of its special four module structure, it has many kinds of cell factor specific binding sites, and its regulation mode is more dependent on the latter, which promotes or inhibits the expression of several important cytokine pathways. In diabetic retinopathy, its expression goes throughout the disease process. The accumulation of connective tissue growth factor plays an important role in promoting the

thickening of basement membrane and the formation of new blood vessels in the early stage of the clinical stage and the formation of the new blood vessels. In this paper, the regulatory mechanism of connective tissue growth factor and the research progress of this factor in DR are systematically expounded.

• KEYWORDS: connective tissue growth factor; diabetic retinopathy

Citation: Liang XD, Wang G, Chen XL. Regulatory mechanism and research progress of connective tissue growth factor in diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2016;16(4):673-677

摘要

糖尿病视网膜病变是一种微血管循环异常的致盲性眼病。在疾病进展后期,血管内皮生长因子抗体类药物因可显著抑制新生血管形成和改善黄斑水肿而被广泛应用于临床。然而,药物应用后纤维化趋势的加重也引起了广泛的关注。结缔组织生长因子作为眼内纤维化的重要细胞因子,在药物应用后过量表达,被认为是引起上述副作用的重要因素之一,也是一种潜在的辅助治疗靶点。整理目前研究进展后发现,结缔组织生长因子的调控机制包括调控下游细胞因子基因表达和直接结合于其他细胞因子或受体两种方式。因其特殊的四模块结构上具有多种细胞因子特异结合位点,其调控方式多依赖于后者,进而促进或抑制了多种重要细胞因子通路的表达。在糖尿病视网膜病变中,其表达贯穿整个疾病进程。在临床前期和新生血管形成末期,结缔组织生长因子的累积分别起到促进基底膜增厚和新生血管纤维化形成的重要作用。本文将对结缔组织生长因子多样化的调控机制及该因子在 DR 中的研究进展进行系统阐述。

关键词: 结缔组织生长因子; 糖尿病视网膜病变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.4.21

引用: 梁曦达, 王光, 陈晓隆. 结缔组织生长因子在糖尿病视网膜病变中的调控机制及研究进展. 国际眼科杂志 2016;16(4):673-677

0 引言

糖尿病视网膜病变(dibetic retinopathy, DR)是一种严重糖尿病微血管并发症。据一项 2015 年的调查显示,我国 DR 的发病率达 1.8%/年^[1]。最新的流行病学调查显示,高血糖和基因遗传是较高血压和异常脂类代谢相

比更为重要的两项 DR 危险因素^[2]。其致病机制主要包括:(1)多元醇代谢通路异常;(2)晚期糖基化终产物形成;(3)蛋白激酶 C 的激活;(4)活性氧的产生;(5)遗传因素^[3]。在高糖和组织缺氧状态下,视网膜微血管扩张,血-视网膜屏障被破坏,新生血管形成,视网膜前纤维血管膜的形成,最终造成牵拉性视网膜脱离。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)作为眼内纤维化的重要始动及调节因子,在 DR 的基底膜增厚,周细胞凋亡与迁移,肌成纤维细胞的过量聚集和细胞外基质的堆积和重构等多项病理改变中均有参与。

1 CTGF 分子结构及调控机制

1.1 CTGF/CCN 家族结构

CCN 家族的提出始于 1990 年代末期,最初其表达的蛋白被归于早期基因的产物或生长因子。最早发现的成员包括富半胱氨酸蛋白 61 (cysteine-rich protein 61, Cyr61), CTGF, 肾母细胞过度表达基因(nephroblastoma-overexpressed, NOV)。其生物学作用覆盖发育分化,血管生成,组织纤维化,炎症作用,肿瘤生长等多个领域^[4]。其中,CTGF 又名 CCN2,是一种可刺激成纤维细胞增殖和胶原沉积的生长因子,在成人心血管、脑、胎盘、皮肤、肾、肝、肺及胰腺等多种组织中均有表达,其中以肾脏组织中含最为丰富^[5]。目前发现的 CCN 家族成员包含 Cyr61、CTGF、NOV、CCN4、CCN5、CCN6。除 CCN5 缺失部分模块外,其余家族成员均具有特征性四模块结构。CCN 家族成员由胰岛素样生长因子结合区(IGFBP)和 Von Wille 因子 C 型重复区(VWC),血小板反应蛋白 I 型重复区(TSP-1)和生长因子半胱氨酸群(CT)四个模块组成。每个模块都具有其独特的结合位点,中间由铰链区域连接,两侧各有两个模块,称之为“-NH₂ 末端”和“-COOH 末端”。在金属基质蛋白酶类(matrix metalloproteinases, MMPs)的水解作用下,CTGF 的铰链结构断裂,分解为 CTGF-N 末端和 CTGF-C 末端,而弹性蛋白酶和血纤维蛋白溶酶可使 CTGF 水解为四个独立片段^[6-8]。

1.2 CTGF/TGF-β 通路

转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)是 CTGF 最为人熟知的上游细胞因子,其通过丝裂原活化蛋白激酶等多个通路诱导 CTGF 的表达,共同诱导细胞外基质的产生^[9]。不仅如此,TGF-β 与 CTGF 还具有直接作用关系。研究人员在 CTGF 的 VWC 模块发现了 TGF-β1 和骨成型蛋白质-4(bone morphogenetic protein-4, BMP-4)的结合位点。CTGF 与 TGF-β1 的结合不会抑制 TGF-β1/TGF-β 受体(TGF-β1/TGF-βR)通路,反而会促进 TGF-β1 与受体结合及下游因子的表达。值得注意的是,CTGF 与 TGF-β1 的结合亲和力较低,且 CTGF 激活 TGF-β1 通路有若干条件限制,如受体和细胞膜结合,Smad2 磷酸化,基因表达活化等。然而,CTGF 的 VWC 模块与 BMP4 结合后,可减少 BMP4 与 BMP4 同源受体的结合来抑制 BMP4 信号通路。这种效应可被 BMP2 和 TGF-β1 竞争性抑制^[10]。

纤连蛋白选择性剪接区域 A (fibronectin-extra domain A, FN-EDA)是纤维连接蛋白 mRNA 的选择性剪接区域发生保留性剪接产生,在血管内皮细胞向间质细胞转化中起

到重要作用。人们在视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)中发现完整 CTGF 和 CTGF-N 末端均可辅助 TGF-β2/TGFβRII 对 FN-EDA 的激活作用,使其表达增加,但两者均不能直接激活 FN-EDA 的表达。TGF-β2 可与 CTGF-N 末端结合验证了这一结论。而 CTGF-C 末端可与 TGFβRII 结合,在给予 CTGF-N 单克隆抗体后,CTGF-C 的过表达可抑制 TGF-β2 对 FN-EDA 的促进作用,可能与 CTGF-C 末端竞争性抑制 TGFβRII 有关。另外,大量激活的 FN-EDA 可促进 MMPs 的产生,进一步促进了 CTGF 水解为 CTGF-N 末端和 CTGF-C 末端^[11]。

1.3 CTGF 与 MMPs

MMPs 是一类锌指肽链内切酶,在细胞外基质的蛋白多糖、胶原蛋白等大分子的生理反和病理降解中有关键作用。不仅如此,MMPs 的底物还可以是细胞因子,如 CTGF、单核细胞趋化蛋白-3(monocyte chemoattractant protein-3, MCP-3)、白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、Fas 配体和胰岛素样生长因子结合蛋白-3(insulin-like growth factor binding protein-3, IGFBP-3)等。其中,MMP-1,-2,-3,-7,-9,-13 均可作用于 CTGF 的铰链区,使之水解断裂为 CTGF-N 末端和 CTGF-C 末端^[12]。在 MMPs 水解 CTGF 后,对于 CTGF-C 末端是否会继续降解存在争议。早在 1998 年,人们就在血清、脑脊液和腹水中观察到了 CTGF 降解产物,大小为 32、24、18kD^[13]。体外实验中发现,-COOH 末端约为 10kD,激活了成纤维细胞和平滑肌细胞中的 DNA 合成。但在 MMPs 水解后的产物中,未发现类似 CTGF-C 末端产物,可能此过程中还有其他蛋白酶类参与 CTGF-C 末端的形成和降解过程^[14]。

除水解作用外,CTGF 与 MMPs 还具有相互调控机制。在软骨细胞中 CCN2 可诱导 MMP-9 和 MMP-13 的表达^[15]。研究者还发现 CCN2 通过肿瘤抑制基因 p53 促进 MMP2 基因的转录活性来参与视网膜新生血管形成^[16]。不仅如此,在细胞外基质重构中发挥作用的 MMP-3,最近被发现可入细胞核,直接调控 CTGF 的转录过程,从而促进 CTGF 和其 mRNA 的表达^[17]。

1.4 CTGF 与 VEGF

在组织的损伤和修复中,新生血管的形成和纤维化的形成是愈合的两个阶段。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和 CTGF,作为各自的关键细胞因子,两者间的相互作用机制较为复杂。在增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)等多种疾病中,CTGF 和 VEGF 的表达均升高,但两者浓度无明显相关性^[18]。在细胞实验中,CTGF 可以被 VEGF-A 诱导产生^[19]。在大鼠实验中,给予糖尿病大鼠 CTGF mi-RNA 治疗后,CTGF mRNA 和 CTGF 蛋白的浓度均显著下降,但纤连蛋白和 VEGF mRNA 水平并无影响。这似乎暗示了 CTGF 可能为 VEGF 的下游细胞因子^[20]。然而研究显示,CTGF 的表达与 VEGF, TGF-β, 视网膜细胞凋亡有密切相关。且 CTGF 的过表达发生于 8~10wk,早于 VEGF 和 TGF-β 的 12wk^[21-22]。这提示 CTGF 应该有除 VEGF 和 TGF-β 之外更早出现的启动因子。

与 TGF-β、BMP-4 结合机制相似,VEGF 也被发现了与 CTGF 的结合位点。CTGF 与 VEGF 的结合位点位于 TSP-1 模块^[9],研究发现 CTGF 可与 VEGF165 结合,形成

CTGF-VEGF165 复合体,进而抑制 VEGF165 的活性表达。与此同时, MMPs 可水解 CTGF-VEGF165 复合体^[12]。VEGF 可被胰蛋白酶降解,但对 MMPs 家族的水解作用不敏感。因此推测, MMPs 通过水解 CTGF-VEGF 复合体,恢复了 VEGF 的活性^[23]。

在 DR 中, VEGF 抗体使用后 CTGF 的含量引发了关注。有文献认为,在疾病早期, VEGF 抗体的使用可以减少 CTGF 的表达。而在 PDR 期,有研究显示 VEGF 抗体的临床应用可以在抑制 VEGF 的含量同时增加 CTGF 的含量,而 CTGF-shRNA 的应用可以同时抑制 CTGF 和 VEGF 的含量^[22,24]。最新研究还发现, VEGF-A 过度表达的 CTGF 通过铰链区与甲酰胺样受体-1 (formyl peptide receptor-like, FPRL1) 结合,促进了 VEGF 的新生血管形成作用^[25]。

总之, CTGF 可被 VEGF-A 诱导产生,过度表达的 CTGF 既可通过与 FPRL1 的结合,促进 VEGF 的新生血管形成作用,也可通过与 VEGF-165 的结合抑制 VEGF 的表达活性,该效应可被 MMPs 削弱。但目前尚未发现 CTGF 在基因表达层面对 VEGF 表达的抑制作用。另外,在 PDR 期, VEGF 抗体的使用可显著增加 CTGF 的含量,这种现象可能由于 CTGF-VEGF165 复合体在 VEGF 抗体作用下的分离。

2 DR 中的 CTGF

2.1 临床前期及非增殖期改变 DR 的早期改变可出现在临床症状之前,包括毛细血管基底膜的增厚,周细胞的损伤和无细胞毛细血管的形成。多项研究认为,基底膜增厚是 DR 早期的特征性改变,且周细胞的损伤和无细胞毛细血管的形成都与之相关。CTGF 的表达是毛细血管基底膜增厚的重要诱导因子,抑制 CTGF 的表达可减少周细胞的损伤和无细胞毛细血管的形成,延缓了 DR 中毛细血管基底膜的增厚变化^[26]。TGF- β 通路通过上调血浆酶原激活物抑制因子-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), Smad7 和纤连蛋白等下游靶基因的表达,在临床前期 DR 的毛细血管基底膜增厚中起重要作用。TGF- β 的表达主要活跃在视网膜内皮细胞和周细胞中,且 CTGF mRNA 在周细胞中亦有表达^[27]。这一结果提示, CTGF 在基底膜增厚中的作用可能与上文所述的 CTGF/TGF- β 协同作用机制有关。

CTGF 在 DR 早期周细胞损伤中作用被多项研究证实。一些研究者认为, CTGF 和视网膜细胞凋亡指数正相关,和周细胞减少比例正相关。且 CTGF 的表达早于微循环和周细胞数目的改变^[28]。在大鼠周细胞中, CTGF 和 CCN1 存在抗周细胞黏附和促周细胞凋亡的活性。另外,磷酸酶抑制剂可反转上述作用,说明 CTGF 和 CCN1 的作用可能与去磷酸化相关^[29]。

2.2 新生血管形成期 CTGF 作为重要促纤维化形成因子,在 DR 患者新生血管形成过程中表达显著提高,但其是否参与新生血管的形成过程至今仍有争议。在体外实验中, Kita 等^[18]认为 CTGF 与牛视网膜内皮细胞的增殖、迁移及孵化于真皮成纤维细胞的人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的体外血管形成过程无关。然而, Shimo 等^[30]

和 He 等^[31]的结果都提示 CTGF 虽不直接促进 HUVECs 和脉络膜内皮细胞的增殖,却可调控 HUVECs 的迁移和体外管腔形成。Lee 等^[25]发现了 CTGF 在 VEGF-A 调节新生血管形成中的协同作用。在 HUVECs 中, VEGF-A 可与细胞膜上 VEGFR 直接结合,促进 HUVECs 的增殖、迁移和血管结构形成过程。与此同时, VEGF-A 诱导的过度表达的 CTGF 可通过铰链区与 FPRL1 的结合,激活了细胞外信号调节激酶、磷酸化和细胞内钙离子浓度,进一步促进了 HUVECs 的迁移和血管结构形成过程。另外, MMP-2 可通过激活 p53 相关基因促进 CTGF 表达,且在新生血管形成早期的基底膜降解,细胞外基质异常堆积等改变中作用显著^[16]。

2.3 纤维血管膜形成期 CTGF 在纤维化形成过程中有重要推动和调节作用^[32]。特定的上游因子激活 CTGF 的初始表达后,过度表达的 CTGF 与 TGF- β 等通路的共同作用,促进细胞外基质重构因子的表达,其中包括大量胶原蛋白。在重建过程中, α -平滑肌肌动蛋白阳性肌成纤维细胞 (α -smooth muscle actin myofibroblasts, α -SMA myofibroblasts) 可以通过自分泌机制产生 CTGF,同时 α -SMA 阳性肌成纤维细胞也是纤维化进程的核心细胞介质^[6]。

在对 PDR 患者的视网膜前纤维血管膜免疫组化实验中发现其中聚集了大量的肌成纤维细胞。CTGF 在 PDR 患者纤维血管膜中的表达主要集中于血管内皮细胞和肌成纤维细胞,并通过局部旁分泌和自分泌途径调节血管新生-纤维化过程^[33-34]。深入研究发现,在 PDR 患者眼内,血管内皮细胞和循环纤维细胞可转化为肌成纤维细胞,并参与病理性纤维化的形成。CTGF 在血管内皮细胞向 α -SMA 阳性肌成纤维细胞转化时所起到重要推动作用^[35]。

在 PDR 患者视网膜纤维血管膜中, CTGF-N 末端在活跃的 PDR 患者和 DR 伴玻璃体出血患者中大量表达,多于非糖尿病患者,完整 CTGF 在各组中相同, CTGF-C 末端低于可检测阈值。且 CTGF-N 末端多位于 SMA 活化肌成纤维细胞中^[36]。

纤维血管膜是 PDR 患者视网膜新生血管的最终形式,但新生血管向纤维增殖膜转换的时机和调控机制一直未被发现。在 PDR 终末期, VEGF 随纤维化的逐渐发展浓度降低,而 CTGF 与纤维化程度明显相关^[37]。随后提出, CTGF/VEGF 和 CTGF 值是评估视网膜纤维化程度最强预测指标^[38]。这项结论还需要进一步研究给予理论支撑和临床证实。

3 其他 CCN 家族因子的功能及与 DR 的关系

3.1 Cyr61 Cyr61 与 CTGF 具有相似的结构,经常两者共同出现参与细胞黏附、细胞增殖、新生血管形成等。Cyr61 是血管生长和正常血管结构形成的重要因子。CTGF 具有促纤维化形成倾向,而 Cyr61 似乎倾向于纤维化的消融。有研究者认为 Cyr61 与 VEGF 共同调控了 CCN2 因过度表达出现的纤维化倾向^[37]。

Cyr61 在 DR 中的作用尚不明确。可以确定的是 Cyr61 是高糖和晚期糖基化终产物的下游因子^[29,39]。Cyr61 在炎症和缺氧状态下可转变为加固状态或称翻译

后缩短状态,这种缩短状态的 Cyr61 生物活性与原 Cyr61 蛋白不同,并且可能是 Cyr61 在疾病条件下的表达状态,因此这种缩短状态的 Cyr61 可能与 PDR 相关^[40]。

3.2 NOV NOV 作为目前 CCN 家族中唯一可以与 CTGF 形成二聚体的家族成员,两者具有直接作用关系。在软骨细胞和滑液细胞中,多研究证实 NOV 拮抗了 CTGF 在成纤维细胞向肌成纤维细胞转化中的作用。眼内是否存在相似机制需要进一步的实验发现^[6]。

4 结语

CTGF,最初以细胞生长因子的身份为人熟知,但人们一直未发现其特异细胞膜受体。其对于周细胞衰老和迁移、基底膜增厚、肌成纤维细胞的聚集和细胞外基质的堆积和重构等作用多通过与其他细胞因子在其四个模块上的特异性结合,促进或抑制该基因通路的表达来实现。CTGF 基因敲除的小鼠不能存活,说明其在皮肤、血管、肝脾等多器官发育中作用不可或缺。但在生理状态下,CTGF 含量常在可检测阈值以下。而在病理环境中,CTGF 含量变化显著,似乎可以成为一种机体的异常信号。CTGF 被 MMPs 水解后,CTGF-N 末端和 CTGF-C 末端各自扮演了与完整 CTGF 不同的角色。有文献认为,CTGF-N 末端作用于胶原蛋白系统的分化,而 CTGF-C 末端作用于 DNA 合成和细胞增殖^[8]。在增殖期 DR 中,玻璃体腔 CTGF-C 末端未被检测出,有研究发现其能与 TGF- β 2 受体特异性结合,在 CTGF-N 末端抗体的应用下对 TGF- β 2 通路起抑制作用^[11],其去向需要进一步研究证实。

CTGF 的表达与 DR 的发生发展关系密切。在 DR 临床前期,CTGF 的异常表达可能为疾病的发生起到重要的提示预警作用。但由于眼内 CTGF 含量与血液 CTGF 含量未见明显相关性,眼内 CTGF 浓度的简易、低廉的检测手段有待进一步发现。在 PDR 期,CTGF 的眼内浓度与眼内纤维增殖程度具有一定相关性。CTGF 的浓度可于玻璃体切割术中取样检测,为术后并发牵拉性视网膜脱离提供一定的风险评估。以上设想尚需进一步的理论证实和临床检测技术支持。在增殖期 DR 末期,VEGF 的浓度呈下降趋势,这可能与 CTGF 的不断表达并与 VEGF 结合并抑制其活性有关。而应用 VEGF 抗体后,VEGF-CTGF 复合体的解离或可解释 CTGF 在玻璃体腔浓度的增加,并成为纤维化趋势的重要原因。同时,CTGF 的家族成员多与 CTGF 相互作用,共同调节纤维化进程。对于 DR 中,新生血管-纤维化的调控开关能否被 CTGF 抑制剂逆转尚需要深入研究予以验证和发现。

参考文献

- 1 Liu L, Wu J, Yue S, et al. Incidence Density and Risk Factors of Diabetic Retinopathy Within Type 2 Diabetes: A Five-Year Cohort Study in China (Report 1). *Int J Environ Res Public Health* 2015;12(7):7899-7909
- 2 Frank RN. Diabetic retinopathy and systemic factors. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2015;22(2):151-156
- 3 陈雨,朱晓华.糖尿病视网膜病变发病机制的研究进展. *国际眼科杂志* 2006;6(2):433-435
- 4 苏炳银,蔡文琴. CCN 家族研究进展. *第一军医大学学报* 2002;22(2):179-183

- 5 刘剑毅,纪淑兴,李世荣. 结缔组织生长因子及其生物学作用. *中国实用美容整形外科杂志* 2004;15(1):44-46
- 6 Kubota S, Takigawa M. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2015;128(3):181-196
- 7 Kubota S, Takigawa M. The CCN family acting throughout the body: recent research developments. *Biomol Concepts* 2013;4(5):477-494
- 8 Grotendorst GR, Duncan MR. Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J* 2005;19(7):729-738
- 9 Klaassen I, van Geest RJ, Kuiper EJ, et al. The role of CTGF in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 2015;133:37-48
- 10 Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, et al. Connective-tissue growth factor(CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002;4(8):599-604
- 11 Khankan R, Oliver N, He S, et al. Regulation of fibronectin-EDA through CTGF domain-specific interactions with TGFbeta2 and its receptor TGFbetaRII. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(8):5068-5078
- 12 Hashimoto G, Inoki I, Fujii Y, et al. Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem* 2002;277(39):36288-36295
- 13 Yang DH, Kim HS, Wilson EM, et al. Identification of glycosylated 38-kDa connective tissue growth factor(IGFBP-related protein 2) and proteolytic fragments in human biological fluids, and up-regulation of IGFBP-rP2 expression by TGF-beta in Hs578T human breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(7):2593-2596
- 14 Brigstock DR, Steffen CL, Kim GY, et al. Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor. *J Biol Chem* 1997;272(32):20275-20282
- 15 Nishida T, Kubota S, Aoyama E, et al. Effect of CCN2 on FGF2-induced proliferation and MMP9 and MMP13 productions by chondrocytes. *Endocrinology* 2011;152(11):4232-4241
- 16 Chintala H, Liu H, Parmar R, et al. Connective tissue growth factor regulates retinal neovascularization through p53 protein-dependent transactivation of the matrix metalloproteinase(MMP)-2 gene. *J Biol Chem* 2012;287(48):40570-40585
- 17 Muromachi K, Kamio N, Narita T, et al. MMP-3 provokes CTGF/CCN2 production independently of protease activity and dependently on dynamin-related endocytosis, which contributes to human dental pulp cell migration. *J Cell Biochem* 2012;113(4):1348-1358
- 18 Kita T, Hata Y, Miura M, et al. Functional characteristics of connective tissue growth factor on vitreoretinal cells. *Diabetes* 2007;56(5):1421-1428
- 19 Kuiper EJ, Witmer AN, Klaassen I, et al. Differential expression of connective tissue growth factor in microglia and pericytes in the human diabetic retina. *Br J Ophthalmol* 2004;88(8):1082-1087
- 20 Pi L, Xia H, Liu J, et al. Role of connective tissue growth factor in the retinal vasculature during development and ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(12):8701-8710
- 21 Yang H, Huang Y, Chen X, et al. The role of CTGF in the diabetic rat retina and its relationship with VEGF and TGF-beta(2), elucidated by treatment with CTGFsiRNA. *Acta Ophthalmol* 2010;88(6):652-659
- 22 Hu B, Zhang Y, Zeng Q, et al. Intravitreal injection of ranibizumab and CTGF shRNA improves retinal gene expression and microvessel

- ultrastructure in a rodent model of diabetes. *Int J Mol Sci* 2014;15(1):1606–1624
- 23 Lauer G, Sollberg S, Cole M, *et al.* Generation of a novel proteolysis resistant vascular endothelial growth factor165 variant by a site-directed mutation at the plasmin sensitive cleavage site. *FEBS Lett* 2002;531(2):309–313
- 24 Winkler JL, Kedeas MH, Guz Y, *et al.* Inhibition of connective tissue growth factor by small interfering ribonucleic acid prevents increase in extracellular matrix molecules in a rodent model of diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2012;18:874–886
- 25 Lee MS, Ghim J, Kim SJ, *et al.* Functional interaction between CTGF and FPRL1 regulates VEGF-A-induced angiogenesis. *Cell Signal* 2015;27(7):1439–1448
- 26 Van Geest RJ, Leeuwis JW, Dendooven A, *et al.* Connective tissue growth factor is involved in structural retinal vascular changes in long-term experimental diabetes. *J Histochem Cytochem* 2014;62(2):109–118
- 27 Van Geest RJ, Klaassen I, Vogels IM, *et al.* Differential TGF- β signaling in retinal vascular cells; a role in diabetic retinopathy? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(4):1857–1865
- 28 Hu YB, Zhang JK, Sun ZY, *et al.* Retinal cell apoptosis, microvascular changes and expression of connective tissue growth factor in experimental diabetic rats. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2011;47(6):521–526
- 29 Liu H, Yang R, Tinner B, *et al.* Cysteine-rich protein 61 and connective tissue growth factor induce deadhesion and anoikis of retinal pericytes. *Endocrinology* 2008;149(4):1666–1677
- 30 Shimo T, Nakanishi T, Kimura Y, *et al.* Inhibition of endogenous expression of connective tissue growth factor by its antisense oligonucleotide and antisense RNA suppresses proliferation and migration of vascular endothelial cells. *J Biochem* 1998;124(1):130–140
- 31 He S, Jin ML, Worpel V, *et al.* A role for connective tissue growth factor in the pathogenesis of choroidal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2003;121(9):1283–1288
- 32 杨敏, 黄海长, 李惊子, 等. 结缔组织生长因子增加 TGF β 活化成肌纤维细胞的作用. *基础医学与临床* 2005;25(1):25–29
- 33 郭长梅, 惠延年, 王雨生, 等. 结缔组织生长因子 mRNA 在增生性糖尿病视网膜病变视网膜前纤维血管膜中的表达. *眼科新进展* 2003;23(2):79–81
- 34 Abu El-Asrar AM, Van den Steen PE, Al-Amro SA, *et al.* Expression of angiogenic and fibrogenic factors in proliferative vitreoretinal disorders. *Int Ophthalmol* 2007;27(1):11–22
- 35 Abu El-Asrar AM, De Hertogh G, van den Eynde K, *et al.* Myofibroblasts in proliferative diabetic retinopathy can originate from infiltrating fibrocytes and through endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT). *Exp Eye Res* 2015;132:179–189
- 36 Hinton DR, Spee C, He S, *et al.* Accumulation of NH₂-terminal fragment of connective tissue growth factor in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2004;27(3):758–764
- 37 Kuiper EJ, Van Nieuwenhoven FA, de Smet MD, *et al.* The angio-fibrotic switch of VEGF and CTGF in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One* 2008;3(7):e2675
- 38 Van Geest RJ, Klaassen I, Lesnik-Oberstein SY, *et al.* Vitreous TIMP-1 levels associate with neovascularization and TGF- β 2 levels but not with fibrosis in the clinical course of proliferative diabetic retinopathy. *J Cell Commun Signal* 2013;7(1):1–9
- 39 Kim KH, Chen CC, Monzon RI, *et al.* Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Mol Cell Biol* 2013;33(10):2078–2090
- 40 Hirschfeld M, zur Hausen A, Bettendorf H, *et al.* Alternative splicing of Cyr61 is regulated by hypoxia and significantly changed in breast cancer. *Cancer Res* 2009;69(5):2082–2090