

# 肝纤维化中 HSC 调控与基质降解的靶向 RNA 干扰实验研究进展

胡静<sup>1</sup>, 王洪武<sup>2</sup>

(1. 湖北职业技术学院医学院, 孝感 432000; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 感染科, 武汉 430030)

**摘要:** 肝纤维化是各种慢性肝损伤因素引起肝组织反复发生炎症损伤, 导致结缔组织异常增生的病理过程。肝纤维化过程复杂, 受多种因素影响。目前认为肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是其关键因素。尽管不断有新的肝纤维化治疗方法的阐释, 但至今临床仍缺乏针对肝纤维化的单一环节特效靶向药物。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)等基因生物技术的发展为该疾病的基因治疗提供了新的途径。近年来 RNAi 在肝纤维化中 HSC 的调控和细胞外基质降解的实验研究发展较快, 文章对此最新研究进展作一综述。

**关键词:** 肝纤维化; 肝星状细胞; 基因治疗

**中图分类号:** R575.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-2478(2019)04-0312-06

肝纤维化是肝脏创伤修复愈合过程的反应。在酒精、有毒代谢产物、自身免疫介质和病毒感染等各种因素的持续刺激下, 肝组织发生炎症反应和纤维化。肝纤维化是一种可逆性损伤, 但如未得到及时有效的控制, 则进展为肝硬化。其中, 在全球范围内, 肝硬化最常见的病因是 HBV、HCV 和酒精<sup>[1]</sup>。随着人们对肝纤维化发生机制认识的加深和基因生物技术应用的发展, 肝纤维化基因治疗逐渐成为抗肝纤维化的研究热点。

## 1 基因治疗的策略

基因治疗是通过合适的生物技术手段, 将外源基因导入靶细胞, 以治疗由基因缺陷和异常引起的疾病。目前根据肝纤维化的发病机制, 基因治疗的策略主要从以下 4 个阶段来阻止肝纤维化的发展<sup>[2]</sup>。

第一阶段是消除病因: 在正常肝细胞于 HBV 和 HCV 等感染引起的肝细胞损伤阶段, 可通过基因技术抑制病毒侵犯和繁殖。

第二阶段是抑制炎症反应: 肝脏免疫微环境中非实质细胞(巨噬细胞等)在激活募集肝外促炎细胞(单核细胞等)的同时, 释放转化生长因子  $\beta$ (transforming growth factor-beta, TGF- $\beta$ ) 等炎症介质, 受损肝细胞亦释放 TNF- $\alpha$  等炎症介质, 使肝脏微

环境炎症反应增加, 肝细胞持续受损。在该环节, 可通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)等基因技术抑制肝脏微环境免疫细胞的激活, 减少促炎细胞的募集, 并对 TGF- $\beta$ 1 等重要炎症介质表达水平进行干预。

第三阶段是抑制肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活: 此阶段在肝脏微环境炎性因子刺激下, HSC 活化并向肌纤维母细胞分化。在该环节, 可通过 RNAi 等基因技术对调控 HSC 激活及分化的关键分子进行干预, 降低 HSC 的活化水平。

第四阶段是抑制细胞外基质的过度蓄积: 在上述条件下, 肝脏细胞外基质降解和生成的平衡被打破, 基质降解减少, 合成增加, 肝组织出现大量细胞外基质, 逐渐形成肝纤维化(图 1)。在该环节, 可通过 RNAi 等基因技术, 干预细胞外基质降解/合成的关键调控分子的表达, 促进基质降解, 抑制基质合成, 阻止纤维化进展。

基因治疗一般选择消除病因、抑制炎症、抑制 HSC、减少细胞外基质合成 4 个阶段进行干预, 阻止疾病的发生、发展。

## 2 基因治疗的方式

目前在肝纤维化基因治疗中, 以 RNAi 为基础的基因沉默技术已经引起学者的重视, 其为抗肝纤维化基因治疗提供了有力支撑。

人工合成外源性 RNAi 中间体, 主要包括短干扰 RNA(short interfering RNA, siRNA)、短发夹

收稿日期: 2018-04-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(NS81100262)

作者简介: 胡静(1977—), 硕士, 讲师, 主要从事肝肺免疫学研究

通信作者: 王洪武(E-mail: hongwuwang@126.com)

RNA(short hairpin RNA, shRNA)和初级微小RNA(primary microRNA, pri-miRNA)(表1)。3种合成中间体各有优劣,相对而言,siRNA基于片段小和可在细胞质内定位激活的特点,易于非病毒载体和精确调控,便于大规模合成和化学修饰,从而在精确性、安全性和稳定性上较好。多个体内实验及细胞实验结果提示 siRNA 对肝纤维化

治疗效果良好。但 siRNA 亦有不足,其存在时间短,需重复给药,而肝纤维化病程较长,使其应用相对受限。表达型 RNAi 激活物可以从稳定的 DNA 模板获得持续提供的效应子,因而具备持续的生物学效应。该形式适用于病毒载体投送系统包装,并可以选择合适的转录调控因子,具备组织特异性和产量可操控性<sup>[3]</sup>。(表1)

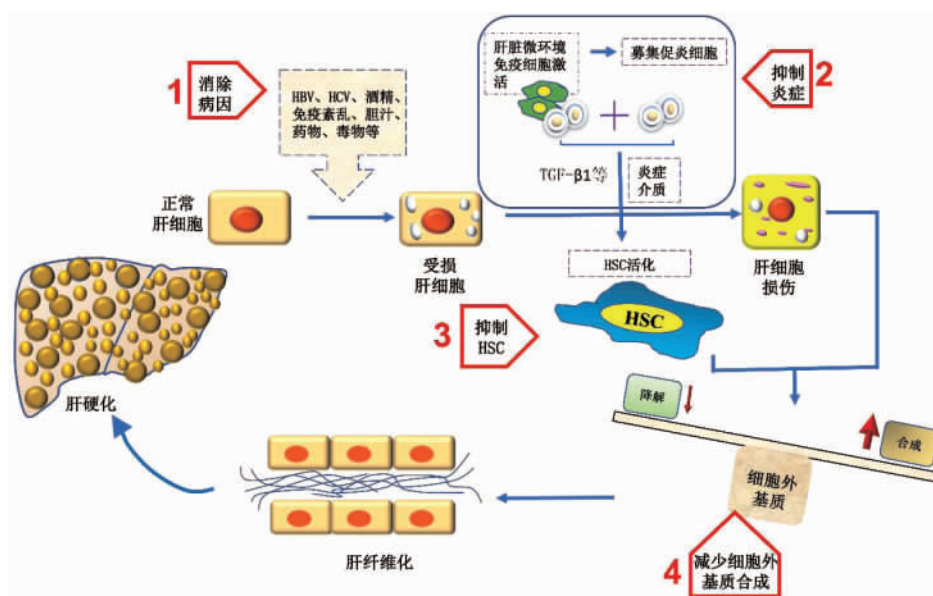


图1 肝纤维化基因治疗策略的4个阶段

表1 治疗肝纤维化的RNAi常见技术

类型	亚细胞定位	投送方式	优势	缺点
siRNA	细胞质	非病毒载体(脂质体等)	剂量易控;化学修饰;细胞质激活;便于规模量产	时效短
shRNA	细胞核	病毒载体(腺病毒等)	易于高效病毒包装;时效长	规模量产成本高;需入核;具有潜在毒性
pri-miRNA	细胞核	病毒载体(腺病毒等)	细胞特异性;易调控;易于高效病毒包装;时效长	规模量产成本高;需入核

### 3 基因治疗靶点

目前肝纤维化的基因治疗靶点主要围绕 HSC 的调控和细胞外基质的降解 2 个方面展开,尤其近年来,关于调控 HSC 活化研究的进展明显增多。

#### 3.1 抑制 HSC 的活化增殖

3.1.1 抑制 TGF-β/Smad 通路 TGF-β 广泛存在于动物正常细胞及多种肿瘤细胞中,属于调节细胞生长与分化的细胞因子家族,具有 5 类亚型,含量最多的为 TGF-β1。TGF-β 是促进 HSC 活化的强效刺激因子。在肝硬化组织中,活化的 HSC、内皮

细胞中的 TGF-β mRNA 表达量与纤维化严重程度相关。TGF-β 可以通过 Smad 和 non-Smad 通路发挥广泛的生物学效应。Smad 蛋白是近年来被发现的分子家族,其是将来胞外的 TGF-β1 信号直接由细胞外转入细胞核内的重要胞内效应因子,在肝纤维化发生中起重要作用。Smad 家族根据其功能可以分为 3 类:(1)受体调节型 Smad(receptor-regulated Smad, R-Smad),包括 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5 和 Smad8;(2)普通型 Smad(common Smad, Co-Smad),只有一种类型——Smad4;(3)抑制型 Smad(inhibitory Smad,

I-Smad), 包括 Smad6 和 Smad7。R-Smad 与细胞膜丝氨酸/苏氨酸受体结合后被活化, Co-Smad 与之结合形成复合物后转导信号至细胞核, 而 I-Smad 负责抑制 R-Smad 效应。在肝纤维化背景下, Smad 家族既有促纤维化成员, 也有抗纤维化成员<sup>[4]</sup>。

miRNA 是一类非编码小 RNA (18~24 nt), 通过结合到 mRNA 上干扰其翻译过程而发挥对基因表达的调节作用。越来越多的研究表明, miRNA 通过对 Smad 的靶向调节, 参与肝纤维化过程和 HSC 的活化。miR-200 过表达抑制 Smad3, 减弱了 TGF-β1 的促肝纤维化效应<sup>[5]</sup>。有研究发现, miR-454 家族在人结直肠癌组织和细胞株中能够靶向抑制 Smad4, 在发生纤维化的肝脏中 miR-454 水平下降, 而 α 平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α-SMA) 和 Smad4 表达水平升高, 提示 miR-454 家族对肝纤维化有抑制作用<sup>[6]</sup>。miR-146a 过表达抑制 TGF-β1 诱导的 HSC 增殖, 增加 HSC 凋亡, 该效应的部分机制是通过抑制 Smad4 表达来实现的<sup>[7-8]</sup>。(表 2)

表 2 常见 miRNA 在肝纤维化中的靶点及作用<sup>[7]</sup>

靶点	miRNA 类型	对肝纤维化的作用
Smad3	miR-199a	增强
	miR-200	抑制
Smad4	miR-454	抑制
	miR-146a	抑制
Smad7	miR-33a	增强
	miR-21	增强

最近亦有学者在不同模型中发现新的 miRNA 抑制效应。Liang 等<sup>[9]</sup>发现 miR-29b 通过抑制 TGF-β1/Smad3 信号通路抑制 HSC 的激活; Liu 等<sup>[10]</sup>分析了正常人肝组织和肝纤维化组织, 发现 miR-144 在肝纤维化组织表达减少, 并且与 TGF-β1 表达相关, 提示 miR-144 可能与调控 TGF-β1 诱导的 HSC 激活有关。相反, Yu 等<sup>[11]</sup>在体外实验和 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化模型中均发现 miR-17-5p 对肝纤维化有增强效应, 其通过降低 Smad7 表达来实现促进 HSC 增殖与活化的作用。周光耀等<sup>[12]</sup>发现 miR-10a 与 HSC 活化密切相关, 并且受 TGF-β 调控, 提示 miR-10a 在肝纤维化和肝硬化的发生、发展过程中起着重要的调控作用。

基于 TGF-β1 信号通路在肝脏炎症和纤维化中的中心作用, 长期以来很多研究以 TGF-β1 为直接

靶点来研究有效干预肝纤维化的途径, 如用 TGF-β1 中和抗体、反义 TGF-β 寡聚脱氧核苷酸、可溶性 TGF-βR II 等来抑制 TGF-β1 信号通路上游以干预肝纤维化。与此同时, TGF-β1 抗炎属性也受到干扰, 难以避免增加肝脏炎症损伤的风险。因此, 考虑到直接干预 TGF-β1 带来的负面效应, 选择其信号通路下游、靶向 Smad 将更有优势。

3.1.2 调节结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF) CTGF 是一种间质细胞生长因子, 具有明显的丝裂原性和趋化性, 可调控细胞增殖、分化、黏附、趋化、迁移、凋亡和细胞外基质的产生。有研究表明 CTGF 与肝纤维化进程密切相关, 其不仅能调控贮脂细胞的分化、增殖, 而且能直接介导原代 HSC 活化、增殖及迁移, 促进 HSC 活化, 使其合成、分泌细胞外基质。在肝纤维化中, 多种类型的细胞产生 CTGF, 但是 HSC 可持续表达 CTGF 并受其调控<sup>[13]</sup>。在 CCl<sub>4</sub> 诱导的 SD 大鼠肝纤维化模型中, 经门静脉注射 CTGF siRNA (0.1 mg/kg), 显著降低 I 型胶原、III 型胶原、层黏连蛋白的分泌, 缓解了肝纤维化的进展程度<sup>[14]</sup>。在由 N-二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化模型中, 将 CTGF siRNA 腹腔注射后能明显降低大鼠体内 CTGF、TGF-β1 水平<sup>[15]</sup>。在脂肪肝患者肝脏组织标本的研究中发现, 激活的 HSC 是 CTGF 的重要来源, 在酒精性肝纤维化模型中使用 CTGF siRNA 可明显降低 HSC 内的 α-SMA 含量, 抑制 I 型胶原表达<sup>[16]</sup>。最近亦有学者发现, miR-29b 通过 TGF-β1/Smad/CTGF 信号通路可以减少瘢痕组织的过度形成<sup>[17]</sup>。miR-143-3p 通过靶向 CTGF/CCN2 及促进 Akt/mTOR 磷酸化, 抑制细胞外基质相关蛋白表达, 抑制瘢痕组织增生<sup>[18]</sup>, 为肝纤维化治疗提供了新的分子治疗基础。

3.1.3 调控神经迁移因子 2 (slit homolog 2 protein, Slit2)/-Robo-1 信号通路 Slit2 及其受体 Robo-1 所介导的信号通路在纤维化疾病中发挥重要的调控作用。Robo-1 是一种单程跨膜受体, 其细胞外结构域包含 5 个 Ig 和 3 个重复的纤维连接蛋白 III 结构域, Robo-1 受体是 Slit2 的分子靶点<sup>[19]</sup>。Slit2/Robo-1 信号通路激活后在肿瘤血管新生、中性粒细胞趋化等过程中发挥重要的调控作用, 但其与纤维化疾病关系的报道甚少。Yuen 等<sup>[20]</sup>合成的 N-端 Slit2 分子可以明显改善缺血再灌注引起的肾脏损伤和纤维化。健康人组织的成纤维

细胞分泌神经导向蛋白 Slit2, 而 Slit2 可抑制人成纤维细胞的分化。Slit2 在健康组织与纤维化位点的相对表达水平, 可能在决定单核细胞分化为成纤维细胞样细胞过程中起重要作用, 这也表明调控 Slit2 信号通路可作为治疗肝纤维化的有效手段<sup>[21]</sup>。Macias 等<sup>[22]</sup>的研究表明, TGF- $\beta$ 1 是 Robo-1 的上游调控子, 诱导 Robo-1 在基底层的特异性表达, TGF- $\beta$ 1 和 Slit2 一起发挥作用, 限制乳腺的分支形成。在 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化模型中, Slit2-Tg 小鼠比 WT 小鼠更容易诱导出肝损伤和进展为肝纤维化。但无论 TGF- $\beta$ 1 存在与否, Slit2-Robo-1 信号通路均对 HSC 的激活发挥重要调控作用。在体外, Robo-1 siRNA 能下调活化 HSC 的 Smad2、Smad3、PI3K 和 Akt 磷酸化水平<sup>[23]</sup>。Slit2/Robo-1 信号通路有望成为调控肝纤维化的一条新的的重要途径。

**3.1.4 抑制血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) / 血小板衍生生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)** PDGF 是导致 HSC 趋化的最强因子。PDGFR 表达于 HSC 上, 与 PDGF 结合后发挥募集作用。在生理状态下, PDGF 由巨核细胞合成, 储存在血小板  $\alpha$  颗粒中, 血小板被激活后可将其释放入血。肝脏受损时, 巨噬细胞、血小板、浸润的炎症细胞、受损的内皮细胞及激活的 HSC 均可合成 PDGF。PDGF 包括 3 种形式的二聚体亚型, 分别为 PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C<sup>[24]</sup>。肝纤维化发生过程中, 在 HSC 细胞膜表面, PDGF-B 与 PDGFR- $\beta$  结合启动的 PDGF-B/PDGFR- $\beta$  信号通路被认为在肝纤维化中发挥重要作用。PDGFR- $\beta$  生理条件下在肝脏表达水平低, 而在 HSC 激活状态下, 其大量表达在 HSC 细胞膜上<sup>[25]</sup>。最近纤维化疾病基因治疗的研究提示 PDGF-C 具有重要的作用。Matsumoto 等<sup>[26]</sup>在硫代乙酰胺和 CCl<sub>4</sub> 2 种不同方式诱导的肝纤维化小鼠模型中发现, miR-29a 可下调 I 型胶原  $\alpha$ 1 和 PDGF-C mRNA 表达, 细胞实验进一步证实其靶向抑制了 PDGF-C 并诱导活化 HSC 的凋亡。Okada 等<sup>[27]</sup>建立的 PDGF-C 过表达转基因小鼠, 于 11 周进展为肝纤维化, 最终于 38 周左右进展为肝癌, LNA-antimiR-214 在体内、体外均可抑制 miR-214 进而明显改善该小鼠模型肝纤维化和肝癌的发生, 提示在 PDGF 信号通路激活诱导的肝纤维化及后续肝癌发展中, LNA-antimiR-

214 具有良好的潜在治疗前景。Wang 等<sup>[28]</sup>发现 miR-9 可以直接靶向 PDGFR- $\beta$  及其下游 ERK1/2, 抑制心肌纤维化的发展, 提示 miR-9 亦有望成为以 PDGF/PDGFR 通路为靶点的抗肝纤维化的基因治疗手段。

**3.1.5 调控高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1, HMGB1)/晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end product, RAGE) 通路** 有研究表明, HMGB1 能与 HSC 表面的 RAGE 结合。在机体内, RAGE 可结合 2 类配体, 包括晚期糖基化终末产物和非晚期糖基化终末产物, 后者包括 HMGB1, 其与 RAGE 的结合力是晚期糖基化终末产物与 RAGE 结合力的 7 倍, 随后进一步激活 HSC<sup>[29]</sup>。在该作用机制的阐释基础上, 研究者开始针对 HMGB1/RAGE 通路进行靶向基因治疗的研发, 以期达到抗肝纤维化进展的目的。有研究表明, RAGE siRNA 经体内注射可以减轻 CCl<sub>4</sub> 诱导的 SD 大鼠的肝脏纤维化程度, 其机制与 RAGE siRNA 蛋白和基因水平下调 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子密切相关<sup>[30]</sup>。另有学者亦在 CCl<sub>4</sub> 诱导的 SD 大鼠肝纤维化模型中, 经尾静脉注射脂质体包裹的 RAGE siRNA, 阻止 HSC 的 HMGB1/RAGE 信号通路激活转导, 最终使肝脏细胞内的 RAGE、 $\alpha$ -SMA、NF- $\kappa$ B、I 型胶原表达量减少, 而且大鼠的血清丙氨酸氨基转移酶、总胆红素等炎症损伤指标下降, 纤维化程度明显缓解<sup>[31]</sup>。体外亦有实验证实, HMGB1 基因特异性 siRNA 通过脂质体包装并转染 HSC, 在明显抑制 HSC 增殖的同时细胞内  $\alpha$ -SMA 和 I、III 型胶原表达显著降低<sup>[32]</sup>。

**3.2 其他调控环节** 肝纤维化作为多种致病因素所致肝硬化的共同病理基础和发病途径, 其实质是细胞外基质如胶原纤维等合成和降解失衡, 导致肝脏 I、III 型胶原等过度沉积, 降解减少。基质金属蛋白酶 (metalloproteinase, MMP) 是细胞外基质降解过程中必不可少的酶, 几乎能降解其所有成分, 其活性可被基质金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) 抑制<sup>[33]</sup>。TIMP 包括 4 种类型, 其中 TIMP-1 在肝损伤中发挥主要作用。在肝纤维化初始阶段, MMP 分泌增加, 能够有效降解胶原。随着纤维化不断进展, 细胞外基质过度沉积, TIMP 分泌开始逐渐增加, 从而抑制 MMP 的活性, 促进纤维化的形成,

最终导致肝纤维化和肝硬化的发生。由此,调节MMP/TIMP平衡亦成为肝纤维化机制中重要的下游环节。

在硫代乙酰胺诱导的肝硬化大鼠模型中,MMP8基因片段和全长分别由腺病毒与HBV嵌合载体包装,经尾静脉注射后,肝脏表面岛屿状结节明显减少,肝脏质地变软,肝小叶结构破坏明显减轻,汇管区和中央静脉周围胶原显著减少,纤维条索变细、变窄,肝细胞水肿好转,炎症细胞浸润减少,肝纤维化程度明显减轻,血清透明质酸、层粘连蛋白等血清肝纤维化指标明显下降<sup>[34]</sup>。有研究表明,以腺相关病毒为载体靶向作用于大鼠TIMP-1的小干扰RNA在体外能够抑制大鼠HSC系TIMP-1基因的表达并使MMP-13表达增加,促进细胞外基质的降解/合成平衡向降解方向发展。进一步体内研究发现,rAAV/siRNA-TIMP-1在CCl<sub>4</sub>和胆管结扎2种大鼠肝纤维化模型中能够显著减轻肝纤维化的程度,降低肝组织 $\alpha$ -SMA及TGF- $\beta$ 水平,增强MMP-13活性及其表达水平,降低HSC活化水平,使细胞外基质降解增多,合成减少,明显改善肝纤维化<sup>[35]</sup>。

#### 4 结语

随着对肝纤维化机制认识的深入,越来越多肝纤维化起始阶段和进展阶段的调节基因逐渐被发现。肝纤维化过程是一个复杂、动态、多基因参与的过程,已经发现针对不同环节靶基因的调控可以呈现出协同效应,所以在将来,肝纤维化基因治疗可由单基因向多基因方向发展,从而逐步实现肝纤维化逆转、结构重建和恢复正常肝功能等最终治疗目的。相信在不久的将来,基因治疗将为肝纤维化的临床治疗提供新的手段。

#### 参考文献

[1] Shiha G, Ibrahim A, Helmy A, *et al.* Asian-pacific association for the study of the liver (APASL) consensus guidelines on invasive and non-invasive assessment of hepatic fibrosis: A 2016 update[J]. *Hepatol Int*, 2017, 11(1): 1-30.

[2] Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 1887-1901.

[3] Gonzalez-Rodriguez A, Valverde AM. RNA interference as a therapeutic strategy for the treatment of liver diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(31): 4574-4586.

[4] Blank U, Karlsson S. The role of Smad signaling in hematopoiesis and translational hematology[J]. *Leukemia*, 2011, 25

(9): 1379-1388.

[5] Wang B, Koh P, Winbanks C, *et al.* MiR-200a prevents renal fibrogenesis through repression of TGF- $\beta$ 2 expression[J]. *Diabetes*, 2011, 60(1): 280-287.

[6] Zhu D, He X, Duan Y, *et al.* Expression of microRNA-454 in TGF- $\beta$ 1-stimulated hepatic stellate cells and in mouse livers infected with *Schistosoma japonicum*[J]. *Parasit Vectors*, 2014, 7(1): 148-155.

[7] He Y, Huang C, Sun X, *et al.* MicroRNA-146a modulates TGF-beta1-induced hepatic stellate cell proliferation by targeting SMAD4[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(10): 1923-1930.

[8] Xu F, Liu C, Zhou D, *et al.* TGF- $\beta$ /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis[J]. *J Histochem Cytochem*, 2016, 64(3): 157-167.

[9] Liang C, Bu S, Fan X. Suppressive effect of microRNA-29b on hepatic stellate cell activation and its crosstalk with TGF- $\beta$ 1/Smad3[J]. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(5): 326-333.

[10] Liu Z, Yi J, Ye R, *et al.* MiR-144 regulates transforming growth factor- $\beta$ 1 induced hepatic stellate cell activation in human fibrotic liver[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(4): 3994-4000.

[11] Yu F, Guo Y, Chen B, *et al.* MicroRNA-17-5p activates hepatic stellate cells through targeting of Smad7[J]. *Lab Invest*, 2015, 95(7): 781-789.

[12] 周光耀, 胡志秋, 郑建建, 等. 微小RNA-10a作为肝星状细胞活化及肝纤维化的分子标志物的研究[J]. *现代免疫学*, 2016, 36(3): 230-237.

[13] Huang G, Brigstock DR. Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17: 2495-2507.

[14] Li G, Li D, Xie Q, *et al.* RNA interfering connective tissue growth factor prevents rat hepatic stellate cell activation and extracellular matrix production[J]. *J Gene Med*, 2008, 10(9): 1039-1047.

[15] Weiskirchen R. Hepatoprotective and anti-fibrotic agents: It's time to take the next step[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 6: 303-343.

[16] Chen L, Charrier AL, Leask A, *et al.* Ethanol-stimulated differentiated functions of human or mouse hepatic stellate cells are mediated by connective tissue growth factor[J]. *J Hepatol*, 2011, 55(2): 399-406.

[17] Guo J, Lin Q, Shao Y, *et al.* MiR-29b promotes skin wound healing and reduces excessive scar formation by inhibition of the TGF- $\beta$ 1/Smad/CTGF signaling pathway [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 95(4): 437-442.

[18] Mu S, Kang B, Zeng W, *et al.* MicroRNA-143-3p inhibits hyperplastic scar formation by targeting connective tissue growth factor CTGF/CCN2 via the Akt/mTOR pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 416(1-2): 99-108.

[19] Bashaw GJ, Kidd T, Murray D, *et al.* Repulsive axon guidance: Abelson and enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor[J]. *Cell*, 2000, 101(7): 703-715.

- [20] Yuen DA, Huang YW, Liu GY, *et al.* Recombinant N-terminal Slit2 inhibits TGF- $\beta$ -induced fibroblast activation and renal fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(9): 2609-2615.
- [21] Pilling D, Zheng Z, Vakil V, *et al.* Fibroblasts secrete Slit2 to inhibit fibrocyte differentiation and fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(51): 18291-18296.
- [22] Macias H, Moran A, Samara Y, *et al.* SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number[J]. *Dev Cell*, 2011, 20(6): 827-840.
- [23] Chang J, Lan T, Li C, *et al.* Activation of Slit2-Robo1 signaling promotes liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(6): 1413-1420.
- [24] Kocabayoglu P, Lade A, Lee YA, *et al.*  $\beta$ -PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(1): 141-147.
- [25] Borkham-Kamphorst E, Weiskirchen R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis[R]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 28: 53-61.
- [26] Matsumoto Y, Itami S, Kuroda M, *et al.* MiR-29a assists in preventing the activation of human stellate cells and promotes recovery from liver fibrosis in mice[J]. *Mol Ther*, 2016, 24(10): 1848-1859.
- [27] Okada H, Honda M, Campbell JS, *et al.* Inhibition of microRNA-214 ameliorates hepatic fibrosis and tumor incidence in platelet-derived growth factor C transgenic mice[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(9): 1143-1152.
- [28] Wang L, Ma L, Fan H, *et al.* MicroRNA-9 regulates cardiac fibrosis by targeting PDGFR- $\beta$  in rats[J]. *J Physiol Biochem*, 2016, 72(2): 213-223.
- [29] Kukkola R, Andersson A, Mullins G, *et al.* RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages[J]. *Scand J Immunol*, 2005, 61(1): 1-9.
- [30] Wang XW, Li WD, Xia JR, *et al.* Small interfering RNA targeting receptor for advanced glycation end products suppresses the generation of proinflammatory cytokines[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(2): 584-590.
- [31] Xia JR, Liu NF, Zhu NX. Specific siRNA targeting the receptor for advanced glycation end products inhibits experimental hepatic fibrosis in rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2008, 9(4): 638-661.
- [32] Ge WS, Wu JX, Fan JG, *et al.* Inhibition of high-mobility group box 1 expression by siRNA in rat hepatic stellate cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(36): 4090-4098.
- [33] Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, *et al.* Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies[J]. *J Hepatol*, 2007, 46(5): 955-975.
- [34] Liu J, Cheng X, Guo Z, *et al.* Truncated active human matrix metalloproteinase-8 delivered by a chimeric adenovirus-hepatitis B virus vector ameliorates rat liver cirrhosis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53392-e53405.
- [35] Cong M, Liu T, Wang P, *et al.* Antifibrotic effects of a recombinant adeno-associated virus carrying small interfering RNA targeting TIMP-1 in rat liver fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(5): 1607-1616.