

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00038

## YKL-40 在肺纤维化大鼠中的动态表达

黄海东, 宁允叶, 李 强\*

第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 观察 YKL-40 在博来霉素诱导的肺间质纤维化大鼠肺组织中的表达。**方法** 以博来霉素(7.5 mg/kg 体重)气管内注入复制大鼠肺纤维化模型, 对照组气管内注入等体积生理盐水。分别于第 7 天、第 14 天、第 21 天分批处死大鼠。通过 H-E 染色、Masson 染色, 并依据 Szapiel 评分方法判断肺组织肺炎及肺纤维化程度, 采用免疫组化、real-time RT-PCR 及蛋白质印迹分析测定肺组织 YKL-40 的表达。**结果** 博来霉素组大鼠肺组织第 7 天肺炎程度( $2.8 \pm 0.45$ )与对照组( $0.42 \pm 0.25$ )相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 之后肺炎炎症减轻, 但至第 21 天( $1.8 \pm 0.84$ )与对照组间差异仍有统计学意义( $P < 0.05$ ); 肺组织纤维化程度在第 14 天( $1.7 \pm 0.73$ )即与对照组( $0.2 \pm 0.45$ )相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 至第 21 天( $2.9 \pm 0.56$ )与对照组间差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。YKL-40 mRNA 相对表达量在第 7 天( $3.71 \pm 0.25$ )即高于对照组( $P < 0.05$ ); 蛋白质印迹分析结果显示, 蛋白水平第 14 天( $0.56 \pm 0.24$ )高于对照组( $0.23 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ), 第 21 天( $1.15 \pm 0.19$ )与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。免疫组化结果显示, 博来霉素诱导大鼠肺组织 YKL-40 的上调表达呈时间依赖性, 且主要来源于平滑肌细胞、肺泡巨噬细胞、肺泡上皮细胞及成纤维细胞。**结论** 随着大鼠肺纤维化进展, YKL-40 表达增加。YKL-40 可能参与肺纤维化过程。

**[关键词]** YKL-40; 肺纤维化; 博来霉素

**[中图分类号]** R 563

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0038-05

### Dynamic expression of pulmonary YKL-40 protein in rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis

HUANG Hai-dong, NING Yun-ye, LI Qiang\*

Department of Respiratory Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the expression of YKL-40 protein in the pulmonary tissues of rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis (PF). **Methods** The PF model group was induced with intratracheal instillation of bleomycin solution (7.5 mg/kg) and the control group was treated with normal saline. On day 7, 14, 21 after bleomycin challenge, rats were sacrificed and the pulmonary tissues were harvested. H-E staining, Masson staining and Szapiel score were employed to determine alveolitis and pulmonary fibrosis. Expressions of YKL-40 in lung tissues were detected by real-time RT-PCR, Western blotting analysis and immunohistochemistry method. **Results** Bleomycin instillation induced alveolitis in the lung of rats, with inflammation score being significantly higher on day 7 ( $2.8 \pm 0.45$ ,  $P < 0.01$ ) and on day 21 ( $1.8 \pm 0.84$ ,  $P < 0.05$ ) compared with that of control group ( $0.42 \pm 0.25$ ). Pulmonary fibrosis degrees in model group was significantly higher on day 14 ( $1.7 \pm 0.73$ ,  $P < 0.05$ ) and on day 21 ( $2.9 \pm 0.56$ ,  $P < 0.01$ ) compared with that of control group ( $0.2 \pm 0.45$ ). YKL-40 mRNA (YKL-40/ $\beta$ -actin) expression was significantly increased on day 7 ( $3.71 \pm 0.25$ ) after bleomycin treatment compared with the control group ( $P < 0.05$ ). Western blotting analysis showed that YKL-40 protein expression was significantly increased on day 14 ( $0.56 \pm 0.24$ ,  $P < 0.05$ ) and on day 21 ( $1.15 \pm 0.19$ ,  $P < 0.01$ ) after bleomycin treatment compared with the control group ( $0.23 \pm 0.07$ ). The results of immunohistochemistry showed that bleomycin up-regulated YKL-40 expression in a time-dependent manner, and YKL-40 expression was mainly located in the smooth muscle cells, alveolar macrophages, alveolar epithelium and fibroblasts. **Conclusion** YKL-40 expression may contribute to the pulmonary fibrosis, and may participate in the pathogenesis of pulmonary fibrosis.

**[Key words]** YKL-40; pulmonary fibrosis; bleomycin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1): 38-42]

肺间质纤维化是呼吸系统的难治性疾病之一, 病理特点表现为早期广泛的肺炎和后期大量胶原

**[收稿日期]** 2011-06-27

**[接受日期]** 2011-12-07

**[作者简介]** 黄海东, 硕士, 主治医师, E-mail: hhdongbs317@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873231, E-mail: liqressh@yahoo.com.cn

增生、纤维化,使肺组织发生不可逆的结构破坏。肺间质纤维化是由多种细胞、细胞因子参与的免疫炎症相关性疾病,其发病机制尚不明确。YKL-40是一种分泌型糖蛋白,在肺、肝、肾、淋巴结等多种组织中表达<sup>[1]</sup>,与纤维化、炎症、组织重塑等有关<sup>[2]</sup>。Furuhashi等<sup>[3]</sup>报道在特发性肺纤维化患者血清中YKL-40的表达量显著高于正常对照,提示其可能与肺纤维化相关。然而YKL-40在肺纤维化过程中肺组织中的表达情况尚未见报道。本研究旨在观察博莱霉素(bleomycin, BLM)诱导的大鼠肺纤维化模型肺组织中YKL-40随肺纤维化进展的动态表达及分布情况,为探讨肺间质纤维化发病机制提供一种新的思路。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级雄性SD大鼠购自第二军医大学实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK(沪)2007-0003。BLM粉剂(15 mg/支,批号:191140)为日本化药株式会社生产,RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司,山羊抗人YKL-40抗体购自Santa Cruz公司,HRP标记GAPDH购自上海康成生物工程有限公司。

1.2 肺纤维化动物模型的建立及分组 健康清洁级雄性SD大鼠20只,体质量(170±10)g,随机分为4组:正常对照组和肺纤维化模型组(BLM 7 d组、14 d组、21 d组),每组各5只。用生理盐水将BLM浓度配为6 mg/ml。采用10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,将大鼠仰卧于手术台上,固定头部及四肢,常规消毒,无菌操作下在颈部正中行1 cm切口,钝性分离暴露气管,于气管软骨环间隙穿刺,以7.5 mg/kg体质量滴注BLM生理盐水溶液<sup>[4]</sup>,滴注后立即将大鼠直立旋转,使BLM均匀分布于两肺,缝合颈部皮肤切口;正常对照组在相同条件下经气管注入等体积生理盐水。待大鼠自然清醒后,置笼内常规饲养。

1.3 动物处理及取材 各组大鼠分别于实验的第7、14、21天处死。10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后,做颈正中切口,充分暴露气管,沿剑突正中切开胸骨暴露心脏,用5 ml注射器于心脏取血处死大鼠。取出肺组织,右肺置于10%甲醛溶液中固定,待行H-E染色、Masson染色和免疫组化。左肺液氮速冻后,-80℃冻存,待行YKL-40蛋白检测。

1.4 肺组织观察 处死大鼠后,肉眼观察双肺的颜色、形态、质地、肺纤维化结节等改变。将右肺组织以4%多聚甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋、切片,行H-E染色、Masson染色,光学显微镜下观察肺组织病理学改变并拍照。

1.5 Real-time RT-PCR检测YKL-40 mRNA水平 用TRIzol法抽提总RNA,用RT-PCR反转录试剂盒反转录为cDNA后进行Real-time PCR扩增。YKL-40上游引物:5'-CCA GAA ACC CCA GAC TGA AG-3',下游引物:5'-TTA GCG TTG GAG ACA ATC CTG-3'; $\beta$ -actin上游引物:5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3',下游引物:5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'。mRNA相对表达量以YKL-40/ $\beta$ -actin比值表示,取3次实验结果的平均值。

1.6 蛋白质印迹分析测定YKL-40蛋白表达量 取约100 mg组织加入500  $\mu$ l蛋白裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 1% 脱氧胆酸钠, 1 g/L SDS, 0.2 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 50 mmol/L NaF)和5  $\mu$ l蛋白酶抑制剂PMSF,匀浆、取上清液。用BCA蛋白定量试剂盒(Pierce公司)进行蛋白定量后,各取20  $\mu$ g总蛋白以12%SDS-PAGE分离,电转移蛋白至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,室温下用5%牛血清白蛋白(BSA)封闭,然后分别与抗YKL-40、抗GAPDH抗体杂交过夜,用结合HRP的二抗孵育,ECL显影、成像。

1.7 免疫组织化学检测YKL-40的表达 将石蜡切片脱蜡、修复、封闭后,滴加稀释的一抗(1:50),室温1 h,加HRP标记的二抗,DAB显色。苏木精复染,盐酸乙醇分化后脱水、透明、封片、镜检观察染色情况。阴性对照组以PBS代替一抗。免疫组化结果以美国Nikon图像采集处理系统进行图像采集,阳性反应表现为棕色或棕褐色。

1.8 统计学处理 根据Szapiel等<sup>[5]</sup>方法,将H-E染色切片肺泡炎症程度分为-~Ⅲ级,将Masson染色切片肺纤维化程度分为-~Ⅲ级,计算病理积分的均值(即平均积分)。病理积分标准为0分=(-),1分=(+),2分=(++),3分=(+++),平均积分=每组病理总积分/每组例数。用Quantity One软件分析蛋白质印迹的灰度图,以目的产物与内参GAPDH的比值表示目的产物的相对表达量,并进行半定量分析,取3次实验的平均值,用均值 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用SPSS 11.5软件对不同处理组与对照组之间进行统计分析,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 肺组织病理学改变 对照组大鼠肺表面光滑,呈粉红色,有弹性。BLM组:实验第7天组大鼠两肺体积略增大,颜色稍暗,可见散在新鲜点状出血灶;第14天双肺颜色稍灰暗,肺表面可见较多的陈

旧性出血点;第21天双肺体积缩小,部分区域肺组织萎缩,色泽苍白,有结节感,弹性差。

H-E染色可见对照组大鼠肺组织结构正常,肺泡完整,无增宽,少数大鼠各级支气管壁及肺泡间隔可见少量炎细胞浸润(图1A)。模型组第7天肺间质及肺泡腔内可见大量的炎细胞浸润(图1B);第14天肺泡间隔明显增厚(图1C),至第21天肺泡炎较前略有减轻,大量肺泡萎陷、结构破坏,肺泡间隔增厚,肺间质增多,肺间质纤维化形成(图1D)。

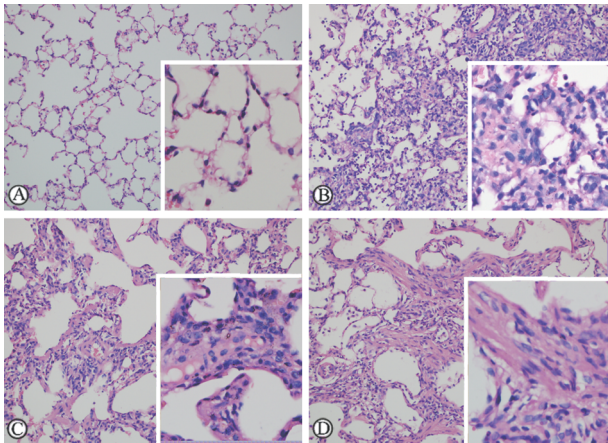


图1 大鼠肺组织 H-E 染色

Fig 1 H-E staining of rat pulmonary tissue sections

BLM: Bleomycin. A: Control group; B: 7 d BLM group; C: 14 d BLM group; D: 21 d BLM group. Original magnification:  $\times 20$ ,  $\times 400$  for the inset

对 BLM 气管滴注后不同时间点的肺泡炎程度进行了双盲量化评分,结果表明,气管滴注 BLM 后第7天肺泡炎明显加重( $2.8 \pm 0.45$ ),与对照组( $0.42 \pm 0.25$ )比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),至第21天 BLM 组肺泡炎有所减轻( $1.8 \pm 0.84$ ),但与对照组间差异仍有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.2 Masson 染色结果 大鼠肺组织石蜡切片经 Masson 染色后可清晰观察到大鼠肺组织纤维化形成,胶原纤维呈蓝绿色,肌纤维呈红色。对照组大鼠肺组织含有少量胶原纤维,为细胞外基质的主要组成部分(图2A)。模型组大鼠在第7天大量炎性细胞浸润,胶原纤维未见明显变化,纤维化程度( $0.4 \pm 0.55$ )与对照组( $0.2 \pm 0.45$ )比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图2B);第14天时出现斑片状纤维化改变,蓝绿色阳染的胶原纤维增多,肺纤维化程度增加( $1.7 \pm 0.73$ ),与对照组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图2C);至第21天肺泡结构破坏,大量胶原纤维沉积,纤维化程度( $2.9 \pm 0.56$ )与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图2D)。

2.3 BLM 诱导 YKL-40 基因表达情况 采用 Real-time RT-PCR 和蛋白质印迹分析检测了随纤维化程度增加肺组织中 YKL-40 基因的表达情况。在转录水平,BLM 气管滴注后 7 d, YKL-40 mRNA 相对表达量增加( $3.71 \pm 0.25$ ),与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );至 14 d YKL-40 mRNA 相对表达量( $5.52 \pm 0.89$ )与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ );第 21 天转录水平有所下降( $4.34 \pm 0.11$ ),但与对照组比较差异仍有统计学意义( $P < 0.01$ )。

正常对照组大鼠肺组织即有本底 YKL-40 蛋白表达,模型组 YKL-40 蛋白表达量随时间延长而增加(图3)。采用 Quantity One 软件对各条带进行灰度扫描后进行半定量分析,BLM 组第 7 天时 YKL-40 蛋白相对表达量( $0.37 \pm 0.08$ )与对照组( $0.23 \pm 0.07$ )比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。YKL-40 蛋白相对表达量在第 14 天( $0.56 \pm 0.24$ )高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),至第 21 天( $1.15 \pm 0.19$ )与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

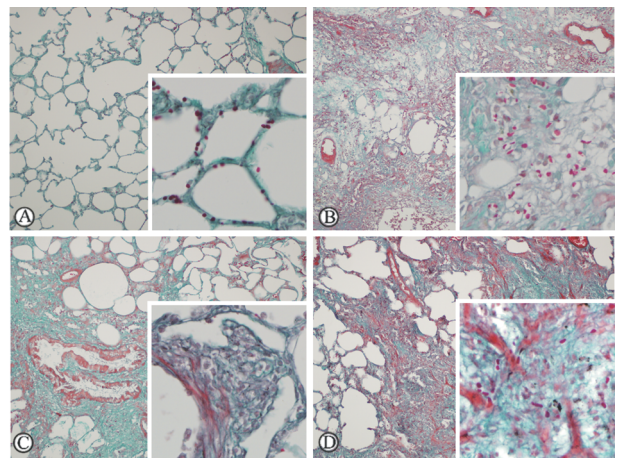


图2 Masson 染色示肺组织纤维化情况

Fig 2 Masson's trichrome staining showing pulmonary fibrosis induced by BLM

BLM: Bleomycin. A: Control group; B: 7 d BLM group; C: 14 d BLM group; D: 21 d BLM group. With Masson trichrome staining, the collagenous fibrous tissue was stained blue, while the smooth muscle and myofibroma were stained red. Original magnification:  $\times 200$ ,  $\times 400$  for the inset

2.4 免疫组化检测 YKL-40 的表达 为了进一步观察随大鼠肺纤维化程度增加 YKL-40 蛋白的表达情况,采用免疫组化对 YKL-40 进行定性和定位研究。结果如图 4 所示,肺组织内 YKL-40 的表达随肺纤维化的形成而逐渐增多,与蛋白质印迹分析结果一致。正常大鼠肺组织中肺泡壁及气道平滑肌层 YKL-40 蛋白有少量表达,平均光密度为  $15.03 \pm$

3.11(图 4A)。模型组随时间的增加,支气管平滑肌层及上皮阳性明显增强,第 7 天 YKL-40 阳染程度略有增加( $21.33 \pm 3.21$ ),但与对照组比较差异无统计学意义(图 4B),第 14 天阳染程度( $29.59 \pm 7.68$ )与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 4C);至 21 d 纤维化严重区域也呈很强的阳性反应,平均光密度为  $48.31 \pm 5.66$ ,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 4D)。

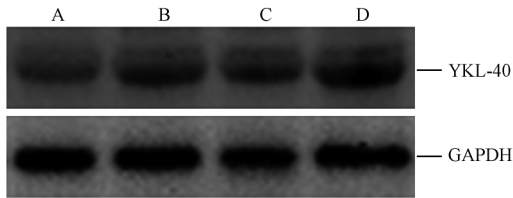


图 3 BLM 诱导的大鼠肺组织 YKL-40 蛋白表达

Fig 3 BLM-induced expression of YKL-40 protein in rat lung tissue as detected by Western blotting analysis

BLM: Bleomycin. A: Control group; B: 7 d BLM group; C: 14 d BLM group; D: 21 d BLM group

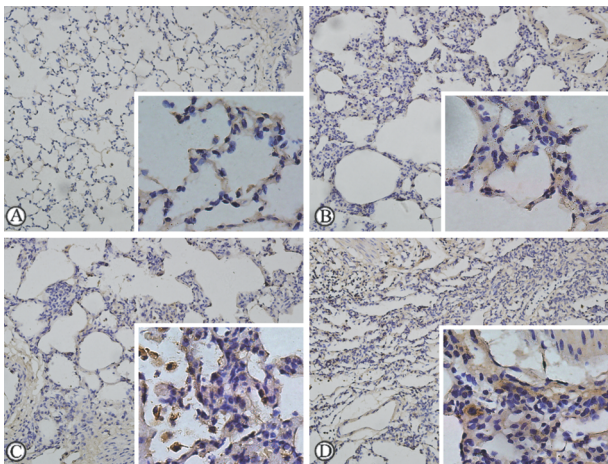


图 4 BLM 诱导肺纤维化大鼠肺组织 YKL-40 表达

Fig 4 YKL-40 protein expression in lung of rats with BLM-induced pulmonary fibrosis

BLM: Bleomycin. A: Control group; B: 7 d BLM group; C: 14 d BLM group; D: 21 d BLM group. Positive staining for YKL-40 presented brown. Original magnification:  $\times 200$ ,  $\times 400$  for the inset

高倍镜下, BLM 21 d 组大鼠肺组织免疫组化切片清晰显示: 肺泡巨噬细胞、肺泡上皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞等都有很强的阳性表达(图 5)。

### 3 讨论

肺间质纤维化是多种因素参与的多种肺疾病的共同结局。肺泡炎是肺纤维化损伤的早期表现, 肺泡内大量巨噬细胞、中性粒细胞等炎症细胞浸润, 随

后在炎症细胞的参与下, 各种细胞因子和炎性介质大量释放, 扩大了组织损伤, 引起肺间质增生, 胶原和其他细胞外基质代谢紊乱, 加重了炎性损伤和增生反应, 最终导致肺纤维化。近年来在肺纤维化发生、发展方面的研究不断有新发现<sup>[6-8]</sup>, 多种细胞因子组成的复杂网络在肺纤维化动态发展过程中起重要作用<sup>[9]</sup>, 然而其发病机制尚不完全明确。

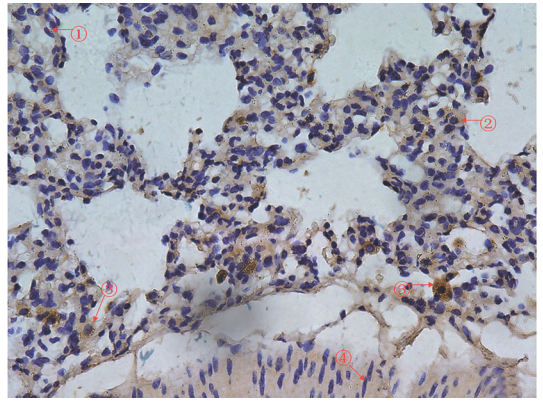


图 5 免疫组化结果示 BLM 诱导 21 d 时肺纤维化大鼠肺组织中 YKL-40 的细胞定位

Fig 5 Immunohistochemistry localization of YKL-40 protein in lung of rats with BLM-induced pulmonary fibrosis on day 21

BLM: Bleomycin. ①: Fibroblast; ②: Alveolar epithelium; ③: Alveolar macrophage; ④: Smooth muscle cell. Original magnification:  $\times 400$

BLM 诱导的鼠肺间质纤维化模型常用于模拟人类间质性肺纤维化病理学改变的全过程, 是目前国内外研究肺纤维化通用的动物模型。其病理特点表现为早期的普通型间质性肺炎和之后的肺间质纤维化<sup>[10]</sup>。本研究中采用 H-E 染色和 Masson 染色观察了大鼠肺纤维化的动态病理改变: 模型组大鼠第 7 天病理显示弥漫性肺泡炎症, 第 14 天炎症和纤维化并存, 至第 21 天时肺纤维化成为主要病变, 表明本研究中大鼠肺纤维化模型成功建立。

YKL-40 是一种糖蛋白, 最早在骨骼蛋白中发现, 因其 N 末端氨基酸由酪氨酸(Y)、赖氨酸(K)、亮氨酸(L)构成, 相对分子质量为 40 000, 故称为 YKL-40。YKL-40 是一种分泌型蛋白, 是成纤维细胞和软骨细胞的生长因子, 与胰岛素样生长因子协同作用<sup>[11-12]</sup>, 参与组织重建和细胞外基质降解等过程, 当组织快速增殖、显著分化、形态学发生变化时 YKL-40 表达增加。Bigg 等<sup>[13]</sup>研究表明, YKL-40 能特异性地结合到 I 型、II 型、III 型胶原上, 调节 I 型胶原纤维的形成。本研究中我们发现成纤维细胞本身即表达 YKL-40, 提示 YKL-40 可能是内源性的促纤维化细胞因子。YKL-40 是一个潜在的肝纤

维化血清标志物<sup>[14]</sup>,有助于判断病变组织纤维化程度和预后<sup>[15]</sup>。我们观察到对照组中即有 YKL-40 的本底表达,提示 YKL-40 在肺组织胶原蛋白表达及维持其正常生物学功能中起着重要作用。大鼠经气管滴注 BLM 后,BLM 组 YKL-40 表达量随着时间的延长而增加,提示其可能参与大鼠肺纤维化的病理发展过程,可能作为一种重要的促肺纤维化内源性因子激活或协同其他细胞因子作用于肺成纤维细胞,诱导其转分化为肌成纤维细胞,合成大量胶原,增加细胞外基质的含量,导致肺纤维化形成。

已有研究表明,YKL-40 在巨噬细胞分化末期大量合成<sup>[16]</sup>,也可以通过活化的中性粒细胞的特异性颗粒释放出来<sup>[17]</sup>。本研究发现,肺泡巨噬细胞是肺纤维化过程中 YKL-40 的重要来源,此外,成纤维细胞、肺泡上皮细胞、平滑肌细胞都能对 BLM 应答,上调 YKL-40 表达,提示 YKL-40 在促炎、促纤维化中扮演重要角色。

特发性肺间质纤维化(IPF)的发病机制十分复杂,涉及的细胞因子众多,Kamal 等<sup>[18]</sup>在肝纤维化临床标本的研究中发现,YKL-40 水平与肝纤维化进展正相关,而与 TGF- $\beta$  的表达正相关,提示 YKL-40 可能与 TGF- $\beta$  有协同作用。然而 YKL-40 在肺纤维化中的具体作用机制及其在 21 d 之后的变化趋势尚需进一步探讨。

本研究结果表明肺部多种细胞对 BLM 应答,致使 YKL-40 在肺纤维化过程中上调表达呈时间依赖性,这为进一步阐明该细胞因子在肺纤维化中的作用奠定了基础,也为深入探讨肺间质纤维化的发病机制提供一种新的思路。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Johansen J S, Jensen B V, Roslind A, Nielsen D, Price P A. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15: 194-202.

[2] Johansen J S, Hoyer P E, Larsen L A, Price P A, Møllgaard K. YKL-40 protein expression in the early developing human musculoskeletal system[J]. *J Histochem Cytochem*, 2007, 55: 1213-1228.

[3] Furuhashi K, Suda T, Nakamura Y, Inui N, Hashimoto D, Miwa S, et al. Increased expression of YKL-40, a chitinase-like protein, in serum and lung of patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Respir*, 2010, 104: 1204-1210.

[4] Taooka Y, Maeda A, Hiyama K, Ishioka S, Yamakido M. Effects of neutrophil elastase inhibitor on bleomycin-induced pulmonary

fibrosis in mice[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156: 260-265.

[5] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, Hunninghake G W, Crystal R G. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120: 893-899.

[6] King T E, du Bois R M. Elucidating the causes and examining the latest clinical findings in pulmonary fibrosis[J]. *Eur Respir Rev*, 2008, 17: 105-107.

[7] Harari S, Caminati A. IPF: new insight on pathogenesis and treatment[J]. *Allergy*, 2010, 65: 537-553.

[8] Vancheri C, Failla M, Crimi N, Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: a disease with similarities and links to cancer biology[J]. *Eur Respir J*, 2010, 35: 496-504.

[9] Antoniou K M, Alexandrakis M G, Sifakas N M, Bouros D. Cytokine network in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Sarcoidosis Vase Difuse Lung Dis*, 2005, 22: 9-15.

[10] 张晓晔, 宁欣, 刘卫青, 周妍, 朱敏. 静脉注射和气管内滴入博来霉素诱导小鼠肺纤维化的差异[J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16: 176-178.

[11] Recklies A D, White C, Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways[J]. *Biochem J*, 2002, 365: 119-126.

[12] Ling H, Recklies A D. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor- $\alpha$  [J]. *Biochem J*, 2004, 380: 651-659.

[13] Bigg H F, Wait R, Rowan A D, Cawston T E. The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen and modulates the rate of type I collagen fibril formation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 21082-21095.

[14] Chambers R C. Abnormal wound healing responses in pulmonary fibrosis: focus on coagulation signalling[J]. *Eur Respir Rev*, 2008, 17: 130-137.

[15] Shin D, Minn K W. The effect of myofibroblast on contracture of hypertrophic scar[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2004, 113: 633-640.

[16] Rehli M, Niller H H, Ammon C, Langmann S, Schwarzfischer L, Andreesen R, et al. Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 44058-44067.

[17] Volck B, Price P A, Johansen J S, Sørensen O, Benfield T L, Nielsen H J, et al. YKL-40, a mammalian member of the bacterial chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils[J]. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998, 110: 351-360.

[18] Kamal S M, Turner B, He Q, Rasenack J, Bianchi L, Al Tawil A, et al. Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis[J]. *Hepatology*, 2006, 43: 771-779.