基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0522-05

SiRNA-Smad3 沉默人瘢痕疙瘩成纤维细胞中 Smad3 对纤维连接蛋白及Ⅰ型胶原表达的影响

刘 波,果 磊
(重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 SiRNA-Smad3 沉默人瘢痕疙瘩成纤维细胞(Keloid fibroblast,KFB)内 Smad3 基因后,对 KFB 细胞内纤维连接蛋白及Ⅰ型胶原表达水平的影响。方法:分别用针对人 Smad3 mRNA 基因的特异性干扰片段和无关干扰片段转染体外原代培养的人 KFB,经 RT-PCR、Western blot、免疫组化、免疫荧光方法检测纤维连接蛋白(fibronectin)及Ⅰ型胶原(Collagen Ⅰ,Col Ⅰ)等 KFB 细胞外基质的合成和分泌情况。结果:75 nmol/L Smad3-siRNA 特异性干扰片段转染 KFB48h 后 KFB 细胞内 Col Ⅰ及 FN 合成和分泌较非特异性对照组及空白对照组明显降低。结论:Smad3-siRNA 可特异性抑制 KFB 细胞中 Smad3 基因表达,并有效抑制体外培养的人原代 KFB 合成和分泌 Col Ⅰ及纤维连接蛋白(Fibronectin,FN)。

【关键词】RNA 干扰;Smad3;瘢痕疙瘩;成纤维细胞
【中国图书分类法分类号】R619.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-09

Effects of SiRNA-mediated Smad3 gene silence on the expression of fibronectin and collagen Ⅰ in human keloid fibroblasts

LIU Bo, et al
(*Department of Burn and Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objectives*: To explorer the influence of siRNA-Smad3-mediated Smad3 gene silence on the expression of fibronectin and collagen Ⅰ in human keloid fibroblasts(KFB). *Methods*: One specific Smad3-siRNA fragment and another irrelevant siRNA fragment was respectively transfected into human primary KFB cells. RT-PCR, Western blot, immunohistochemisty and immunofluorescence were employed to evaluate the changes in either the expression or the secretion of both fibronectin and collagen Ⅰ. *Restults*: The expression and secretion of both the fibronectin and collagen Ⅰ in KFB were inhibited significantly by the treatment of Smad3-siRNA for 48 hours at a final concentration of 75nmol/L as compared with those of the untreated or the irrelevant siRNA fragment treated group. *Conculsion*: Smad3-siRNA could be employed to specifically inhibit the Smad3 gene expression in KFB cells and to efficiently inhibit both the synthesis and secretion of fibronectin and collagen Ⅰ.

【Key words】RNA interference; Smad3; Keloid; Fibroblast

瘢痕疙瘩(Keloid)是皮肤损伤后形成的过度瘢痕化组织,以成纤维细胞等修复细胞在创伤后增殖加速并大量合成细胞外基质在局部过度积聚为病理学基础。Smads 蛋白是 TGF-β 受体下游重要的信号分子,作为一级信号转导分子直接与 TGF-β 受体结合,介导 TGF-β 的生物学效应,参与细胞的增殖、分化,炎症反应以及胶原合成等调节,观察其对成纤维细胞主要细胞外基质Ⅰ型胶原(Collagen Ⅰ,Col Ⅰ)及纤维连接蛋白(Fibronectin,FN)合成和分泌的影响,以明确利用 RNA 干扰技术沉默 Smad3 后对 KFB 细胞胶原合成的抑制效应,为进一步将 SiRNA 干扰技术应用于临床提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

siRNA 特异性干扰片段和非特异性无关干扰片段均由 Ambion(USA)公司合成,SiPORTTM Lipid Transfection Agent 购于 BD 公司,总 RNA 抽提试剂盒、RT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司,Smad3 及 GAPDH 内参引物由上海生工设计合成,大鼠抗人 FN 抗体及大鼠抗人 Col Ⅰ抗体购于美国 Sant cruz 公司,FITC 标记的兔抗山羊 IgG 二抗和纯山羊血清购于北京鼎国生物有限公司,ABC 免疫细胞化学检测试剂盒和 DAB 显色剂购自北京中山金桥生物技术有限公司,成

作者介绍:刘 波(1978-),男,硕士,
研究方向:增殖性瘢痕的发病机理。
通讯作者:果 磊,女,副教授,E-mail:cqguolei@sina.com。
基金项目:重庆医科大学创新基金(编号:CX 200506)。

纤维细胞培养专用 Gibco 特级胎牛血清、化学发光检测试剂盒及精确蛋白分子量 Marker 等均购于基因公司。其它常规化学试剂为分析纯以上产品。

1.2 标本来源

实验中所用瘢痕疙瘩标本均取自本院外科手术治疗的患者,患者均无明显创伤史,瘢痕疙瘩具有浸润生长的特点,均经临床和病理确诊。共收集 5 例瘢痕疙瘩标本,其中男 2 例,女 3 例;部位分布:包皮 2 例,耳垂部 1 例,颈部和臀部各 1 例。所有标本的采集都征得患者的书面同意。

1.3 方法

1.3.1 人瘢痕疙瘩成纤维细胞(Keloid fibroblast,KFB)细胞的分离和原代培养 将手术切下的瘢痕疙瘩组织采用组织块贴壁培养法进行体外培养,具体方法参考引文[2]操作。实验用第 4~8 代对数生长期细胞。

1.3.2 小分子 RNA 干扰(siRNA)片段的设计及合成 根据人 Smad3 基因的 mRNA 序列(GenBank 登录号 NM-005902)及 siRNA 设计原则,结合美国著名的 Ambion 公司提供的网上在线设计工具,设计 3 对含 21 个碱基的 Smad3-siRNA 序列,分经 BLAST 比对确认所设计的 siRNA 序列的特异性后提交 Ambion 公司合成,制成有效双链 siRNA 干粉制剂保存。经前期实验筛选出有效干扰链。序列如(表 1)所示,同时提供随机序列作为非特异性干扰对照 siRNA。

1.3.3 Smad3-siRNA 片段转染体外原代培养的人 KFB 细胞 具体步骤参阅 SiRNA 与 RNAi 实验技术手册。

1.3.4 半定量 PT-PCR 测定 Col Ⅰ和 FN mRNA 表达水平的变化 实验分为如下 3 组:特异性 siRNA 干扰片段转染组(Smad3-siRNA)A1,非特异性干扰实验组 A2 和空白对照组 A3。Trizol 法提取以上各实验组 KFB 细胞总 RNA,鉴定 RNA 完整性并进行 RNA 定量后按 RT-PCR 试剂盒操作说明书进行逆转录和 PCR 扩增。

PCR:按照说明书标准程序进行扩增,FN 及内参 β-actin 和 Col Ⅰ及内参 GADPH 的引物序列和 PCR 扩增后的产物片段长度见(表 2),扩增条件见(表 3)。

反应条件如下:96℃ 4 min,1 个循环;96℃ 1 min,54℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35 个循环;72℃ 10 min 1 个循环。以上 PCR 反应产物经 1.8%琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad 凝胶成像仪上观察结果并照相,用 Bio-Rad 凝胶成像系统自带 Quantity One 软件分析结果,以目的条带和内参条带的密度之比表示,并根据比值确定目的基因在细胞内表达。

1.3.5 Western Blot 检测 Col Ⅰ和 FN 蛋白表达水平的变化 实验分组同上,按蛋白提取试剂盒说明分别提取各实验组细胞总蛋白并定量后,依照标准方法进行 SDS-PAGE 变性电泳,转移至 PVDF 膜,按各自反应体系分别加入大鼠抗人 FN 和 Col Ⅰ多克隆抗体(一抗,1:400 稀释)于 4℃孵育过夜并洗膜后,FN 体系再按 0.2 ml/cm² 膜的比例加入辣根酶标记的兔抗大鼠 IgG 抗体(二抗,1:200 稀释);Col Ⅰ体系按 0.2 ml/cm² 膜的比例加入辣根酶标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体(二抗,1:300 稀释)于 37℃孵育 2 h 后洗膜,用增强化学发光法试剂盒显色后于化学发光检测仪中检测荧光强度并照相,cool imager 软件分析结果,结果以目的条带的密度与内参条带的密度之比表示。

1.3.6 免疫组织化学染色检测 FN 在 KFB 内分布 用 PBS 洗涤以上各实验组细胞 2 次后,置于 -20℃预冷的甲醇中固定 20 min,PBS 液清洗振荡 3 次,每次 5 min,0.3%破膜剂 TRITON X-100 透膜处理 10 min,PBS 液清洗振荡 3 次,每次 5 min,3%H_2O_2 孵育 5 ~ 10 min 后蒸馏水冲洗,PBS 液浸泡 5 min。滴加试剂 A,室温孵育 10 min,弃上清。滴加(1:200 稀释)的兔抗人 FN 多克隆抗体,4℃过夜。PBS 液冲洗 3 次,每次 5 min。滴加试剂 B,37℃避光孵育 10 ~ 15 min。PBS 液冲洗 3 次,每次 5 min。滴加试剂 C,37℃孵育 15 min。PBS 液冲洗 3 次,每次 5 min。按 DAB 显色试剂盒说明书进行显色,封片后,显微镜观察免疫组化染色结果,计算任意 10 个高倍视野下总阳性细胞数占总细胞数的百分比,重复 3 次取均值。判断标准如下:胞浆或胞核未见确切染色颗粒为阴性;浅而淡的黄棕色颗粒为弱阳性;较深黄棕色颗粒为中度阳性;深黄棕色颗粒则为强阳性。

1.3.7 Col Ⅰ细胞免疫荧光染色 Col Ⅰ在 KFB 内分布 实验分组同前,取各实验组细胞用 PBS 洗涤 3 次后,放入 -20℃预冷的甲醇中固定 20 min。用 PBS 液振荡 3 次,每次 5 min。用 0.3%破膜剂 TRITON X-100 渗透 10 min。用 PBS 液振荡 3 次,每次 5 min。用 5%的正常山羊血清封闭 30 min,甩掉多余的封闭液。加入(1:200)稀释的山羊抗人 Col Ⅰ多克隆抗体(用 PBS 液配制)。放入预先准备的温盒 4℃过夜,防止液体流失或干片。16 h 后取出并用 PBS 液振荡 3 次,每次 5min。按 1:500 滴加亲和素标记 FITC 标记的兔抗山羊 IgG 二抗。全程避光,37℃避光孵育 1 h。用 PBS 液避光振荡 2 次,每次 5 min。晾干,用 50%缓冲甘油封片、观察。日本 Nikon 荧光显微镜进行图像分析,比较干扰 Smad3 后 Col Ⅰ在细胞核及胞浆中分布的变化情况。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 SiRNA-Smad3 对 FN mRNA 表达的影响

转染 48 h 后,RT-PCR 结果表明,SiRNA-Smad3 干扰组 FN mRNA 的扩增带亮度明显减弱,为空白对照组的 38.7%($P<0.05$),但未抑制 β-actin mRNA 的表达,其 β-actin mRNA 水平与非特异性片段转染对照组及空白对照组无明显差异,提示实验组 siRNA 成功抑制 FN 基因的表达。应用 Image Master VDS 图象系统分析结果,以空白对照组的 RT—PCR 条带光密度值为标准(亮度定为 100),其中细胞内源基因 β-actin 片断条带亮度相近,而 Smad3 基因片段条带的亮度,siRNA-smad3 转染实验组和非特异性片段转染对照组的光密度值分别是空白对照组的 38.7%和 96.4%,结果见(图 1)。

2.2 Western Blot 测定 siRNA-Smad3 对人对 FN mRNA 表达的影响

应用 Western Blot 检测转染 siRNA 后 48 h,siRNA-

smad3 干扰实验组 FN 蛋白的杂交条带明显减弱，为空白对照组的 33.6%（$P<0.05$）。非特异性片段转染对照组及空白对照组的 FN 蛋白的表达无明显差异。应用 Image Master VDS 图象系统分析结果，以空白对照组的蛋白条带为标准（亮度定为 100），siRNA-smad3 干扰实验组、非特异性片段转染对照组 FN 基因片段条带的亮度分别是转染空白对照组的 33.6%和 92.7%，结果见（图 2）。

2.3 免疫组化法（ABC 法）测定 SiRNA 干扰 Smad3 基因对人瘢痕疙瘩成纤维细胞分泌 FN 的影响

各组成纤维细胞胞浆染成棕色。实验组 FN 阳性表达率为 32.54%±7.16%，与对照组（63.07%±5.79%）相比有显著性差异，$P<0.05$；非特异性片段转染对照组 FN 阳性表达率为 57.27%±5.15%，与对照组相比无显著性差异，$P>0.05$。见（图 3）。

2.4 RT-PCR 测定 SiRNA-Smad3 对人瘢痕疙瘩成纤维细胞 Col Ⅰ基因的 mRNA 表达的影响

转染 48 h 后，RT-PCR 产物的琼脂糖电泳结果表明，3 组泳道中细胞内源 GAPDH 基因片断条带的亮度强弱相似，说明 RT-PCR 中加入的模板的量一致，而扩增的 Col Ⅰ基因电泳带与其余各组相较亮度明显减弱，为空白对照组的43.7%（$P<0.05$），提示特异性干扰组 siRNA 成功抑制 Col Ⅰ基因的表达。以空白对照组的 RT—PCR 为标准（亮度定为 100），其中细胞内源基因 GAPDH 片断条带亮度相近，转染实验组、非特异性片段转染对照组 Smad3 基因片段条带的亮度分别是转染空白对照组的 43.7 %、93.9%见（图 4）。

2.5 Western Blot 测定 Col Ⅰ蛋白表达

应用 Western blot 检测转染 siRNA 后 48 h，实验组 Col Ⅰ蛋白的杂交条带明显减弱，为空白对照组的 26.9%（$P<0.05$），而非特异性片段转染对照组 Col Ⅰ蛋白杂交条带表达与空白对照组比较，未见明显差异，结果提示特异性干扰组有效干扰 KFB 内 Col Ⅰ蛋白表达。应用 Image Master VDS 图象系统分析结果，以空白对照组的蛋白条带为标准（亮度定为 100），转染实验组、非特异性片段转染对照组 Col Ⅰ蛋白片段条带的亮度分别是转染空白对照组的 26.9%和 96.9%，见（图 5）。

2.6 免疫荧光化学检测 Col Ⅰ蛋白在成纤维细胞中的分布

免疫荧光化学检测显示：非特异性片段处理组瘢痕疙瘩成纤维细胞中 Col Ⅰ蛋白强表达，多表达在细胞浆内。用特异性 SiRNA 干扰 Smad3 后 48 h，成纤维细胞生长形态良好，细胞浆内 Col Ⅰ蛋白荧光表达减弱，细胞核内几乎没有 Col Ⅰ蛋白的荧光表达，而非特异性干扰片段处理组 KFB 细胞内 Col Ⅰ的表达不受影响，与空白对照组类似，结果见（图 6）。

表 1 Smad3-siRNA 干扰片段的序列

序列名	碱基序列
Smad3-siRNA（特异干扰链）	5'-GCACAUAAUAACUUGGACCTT-3'
	5'-GGUCCAAGUUAUUAUGUGCTG-3'
Smad3-siRNA（非特异干扰链）	5'-GGACAGCGGGAAAAAUCGATT-3'
	5'-UCGAUUUUUCCCGCUGUCCTG-3'

表 2 各扩增引物序列

序列名	碱基序列
FN 正义序列（108 bp）	5'-GAT GTG ATG TCG ATT CCA T-3'
反义序列	5'-GAT CTC TGG TCC ATG AAG AT-3'
β-actin 正义序列（446 bp）	5'-GTT GCG TTACAC CCT TTC TTG ACA -3'
反义序列	5'-GCA CGA ACG CTC ATC ATT CAA AA -3'
Col Ⅰ正义序列 （156 bp）	5'- AGGGTCATCGTGGCTTCT -3'
反义序列	5'- CCTTCGCTTCCATACTCG -3'
GADPH 正义序列(450 bp)	5'- ACCACAGTC CATGCCATGCCATCAC -3'
反义序列	5'- CCACCACCCTGTTG CTGTAG -3'

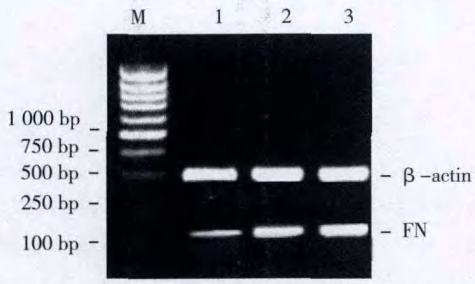
表 3 RT-PCR 扩增条件

反应体系	剂量
10×PCR buffer	2.5 μl
25 mmol $MaCl_2$	4 μl
目的基因正义序列	2 μl
目的基因反义序列	2 μl
β-actin(GADPH) 正义序列	2 μl
反义序列	2 μl
Taq DNA 聚合酶	1 μl
dH_2O	13.5 μl

3 讨 论

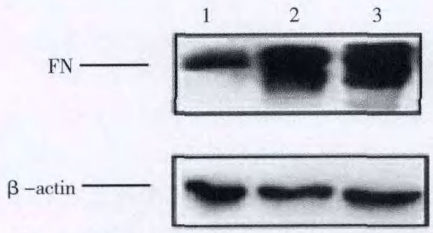
瘢痕疙瘩是一种特殊类型的疤痕，以 ECM 的过度沉积为最主要的组织病理学特征，成纤维细胞是合成 ECM 胶原蛋白的主要细胞，故对成纤维细胞生长和代谢的调控对瘢痕疙瘩形成有重要意义。TGF-β 影响伤口愈合的所有阶段，是成纤维细胞的强效趋化因子[1,2]。TGF-β 作用于伤口成纤维细胞，刺激多种基质蛋白包括 FN 和胶原基因等的转录，并通过调节蛋白酶的表达抑制基质降解[3]，还能刺激成纤维细胞产生内源性 TGF-β，形成正反馈刺激作用。已经证实，TGF-β 在增生性瘢痕、瘢痕疙瘩等纤维化病变发生、发展过程中起关键性作用[4,5]。由于活化的 TGF-β 须与受体结合并将胞外信号传递入胞核才能发挥作用，然而 TGF-β 与相应受体结合后信号转导致细胞内传导途径有多种，但目前研究发现与创伤愈合特意关联通路是 Smads 信号转导系统。

Smad 蛋白是激活后的 TGF-β_1 受体作用底物，是 TGF-β 信号转导的主要通路[6]，负责将 TGF 受体激活后的信号从细胞质传递到细胞核内，并作用于靶基因，从而激活转录[7]。其中 Smad2、Smad3 主要为 TGF-β_1 受体识别，是 TGF-β_1 受体作用底物。TGF-β_1 与其受体结合后，可激活启动性 Smads 即 Smad2 和 Smad3，进而与共同通路性 Smad 即 Smad4，形成三聚体转位到核内，上调与 ECM 合成相关基因的表达。作为 TGF-β 受体底物之一和重要的正向调控因子，Smad3 参与调节胶原的合成，并在瘢痕组织中高表达[8]。Poncelet[9]



M. DNA 标准；1.特异性干扰组；2. 空白对照组；3. 非特异性片段转染对照组

图 1 RT-PCR 检测 SiRNA-Smad3 对 FN mRNA 表达的影响



M. DNA 标准；1.特异性干扰组；2. 空白对照组；3. 非特异性片段转染对照组

图 2 Westhen Blot 监测 FN 在 KFB 中的表达

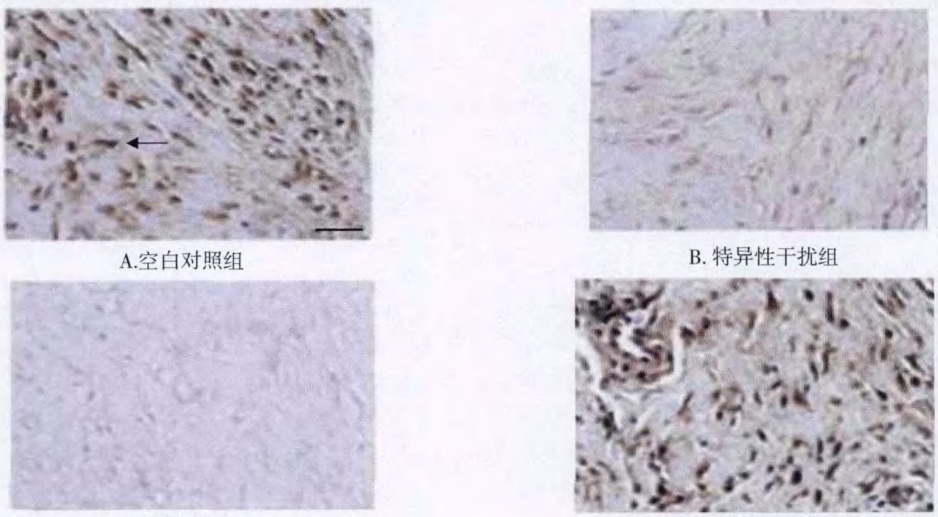
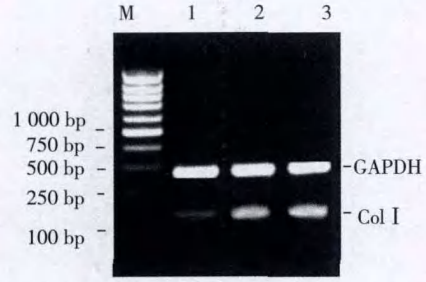
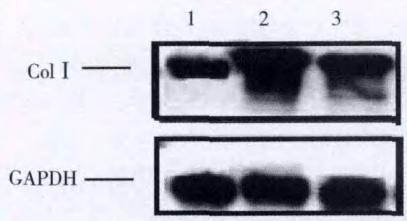


图 3 免疫组化检测 SiRNA-Smad3 对 FN 蛋白表达的影响



M. DNA 标准；1.特异性干扰组；2. 空白对照组；3. 非特异性片段转染对照组

图 4 RT-PCR 检测 Col Ⅰ在 KFB 中的表达



M. DNA 标准；1.特异性干扰组；2. 空白对照组；3. 非特异性片段转染对照组

图 5 Westhen Blot 监测 Col Ⅰ在 KFB 中的表达



A. 空白对照组　　B. 非特异性片段转染对照组　　C. 特异性干扰组

图 6　免疫荧光检测 SiRNA-Smad3 对 Col Ⅰ蛋白表达的影响

等发现系膜细胞经 TGF-β 刺激后，Smad2 和 Smad3 的磷酸化与Ⅰ型胶原等细胞外基质的基因转录增加密切相关。近年来，Chen 等[10]在体外培养的人皮肤成纤维细胞中，发现 Smad3 介导了由 TGF－β_1 所诱导的 Col Ⅰ基因的转录。因此，通过减弱 Smad3 表达或加强负反馈的抑制性 Smad 基因的表达阻断 TGFβ 诱发的相关靶基因转录在瘢痕形成中具有重要作用。

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）技术是近年发展起来的一项新技术。利用 RNAi 技术可以特异地沉默靶基因的作用，通过“敲除”1 个或多个特异蛋白的表达来减慢或终止疾病的致病过程，从而达到治愈疾病的目的。

目前，对于 Smad 蛋白介导的 TGF-β 信号转导通路相关研究已见诸报道，但对 Smad 蛋白介导的 TGF-β 信号转导通路对瘢痕疙瘩形成机制影响研究较少，sh 虽然已有报道称用反义核苷酸技术干扰 Smad 蛋白转导途径促使 TGF-β 1mRNA 下调，但对于该信号转导通路中最重要的正向调控因子 Smad3 阻断后，对于瘢痕疙瘩成纤维细胞及其所产生的效应产物 EC 的影响还缺乏相关实验研究。本研究利用 SiRNA-Smad3 特异性沉默原代培养的人 KFB 细胞 Smad3 基因后，通过对下游效应产物 FN 及 Col Ⅰ的检测发现，SiRNA-Smad3 干扰人 KFB 细胞组与非特异性干扰组及空白对照组比较，瘢痕疙瘩成纤维细胞的下游主要效应产物 FN 及 Col Ⅰ明显降低，说明利用 RNA 干扰技术沉默 Smad3 基因后，可抑制其对 TGF-β/Smads 信号通路的正向调控效应，同时可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞对下游效应产物 Col Ⅰ和 FN 的合成和分泌，ECM 合成降低，从而抑制瘢痕疙瘩形成。瘢痕主要由成纤维细胞及其分泌的细胞外基质构成，而基质合成和分泌的变化取决于成纤维细胞的活动，对 Col Ⅰ和 FN 的检测也可反映成纤维细胞的分裂、增殖等生物学行为变化，因此 Col Ⅰ和 FN 合成和分泌的减少证明 SiRNA 干扰 Smad3 基因后成纤维细胞合成和分泌 ECM 活动减弱，生物学活性降低，阻止了成纤维细胞所致的过度瘢痕化趋向。因此，利用 SiRNA-Smad3 沉默 Smad3 预期能够有效抑制增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的形成。同时，与既往其它干扰 TGF-β/Smads 转导通路技术相比较，利用 RNA 干扰技术沉默 Smad3 基因特异性好，技术较为成熟，可操作性强。但也有研究[11]证明，创床基质合成和沉积不依赖于 Smad3，同时体外实验结果证明 FN 的合成是 TGF-β 经 C-jun 途径诱导的；Ⅰ型和Ⅶ型胶原的合成均部分依赖于 Smad 信号途径，但 Smad3 缺失对其影响尚未确定。故对于利用 RNAi 技术沉默 Smad3，抑制 KFB 增殖和分裂及 ECM 合成和分泌的生物学效应，还有赖于进一步在动物瘢痕模型实验中进行研究和验证。

参 考 文 献

[1] Moustakas A, Stoumaras C.Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transfomed fibroblasts[J].J.Cell Sci, 1999, 112(8): 1169.

[2] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation [J]. J Invest Dermatol, 2002, 118(2): 211.

[3] Eickelberg O, Kohler E, Reichenbenger F, et al. Extracelluler matrix deposition by primary human fibroblast in response to TGF-beta and TGF-beta3[J].Am J physiol, 1999, 276(5): 814-824.

[4] 蒋 炜，王吉耀，杨长青，等.反义转化生长因子 β1 型受体表达质粒对实验性肝纤维化的影响[J].中华医学杂志，2002，82(17)：1160-1164.

[5] 杨 力，柴玉波，李荟元，等.转化生长因子 β1 对瘢痕疙瘩成纤维细 Smad3，7 mRNA 表达的影响[J].中国临床康复，2003，7(14)：2004.

[6] Derynck R, Femg X H.Biochimica, TGF-beta receptor signaling[J]. Biophysica Acta, 1997, 1333(2): 105-150.

[7] Massague J, Hata A, Liu F.TGF-beta signaling though the Smad pathway[J]. Trends Cell Bid, 1997, 7(5): 187-192.

[8] Sumiyoshi K, Nakao A, Set oguchi Y, et al.Smads regulate collagen gel contraction by human dermal fibroblasts[J].Br J Dermatol, 2003, 149(3): 464 -470.

[9] Poncelet A C, Schnapar H W.Sp 1 and Smad proteins cooperate to mediate transfprming growth factor-beta 1-induced alpha 2(I)collagen expression in human glomerular mesangial cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 6983-6992.

[10] Chen S W, Leveneon A S, Mori Y, et al. Stimulation of type Ⅰ collagen transcription in human skin fibroblast by TGF-β involvement of Smad3[J].J Invest Dermatol, 1998, 112(1): 49.

[11] Hocevar B A, Brown T L, Howe P H. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway[J].EMBO, Mar, 1999, 18(5): 1345-1356.

（责任编辑：冉明会）