

# RT-PCR联合凝胶电泳成像技术检测体外培养小鼠肺成纤维细胞转化生长因子 $\beta$ 1的表达

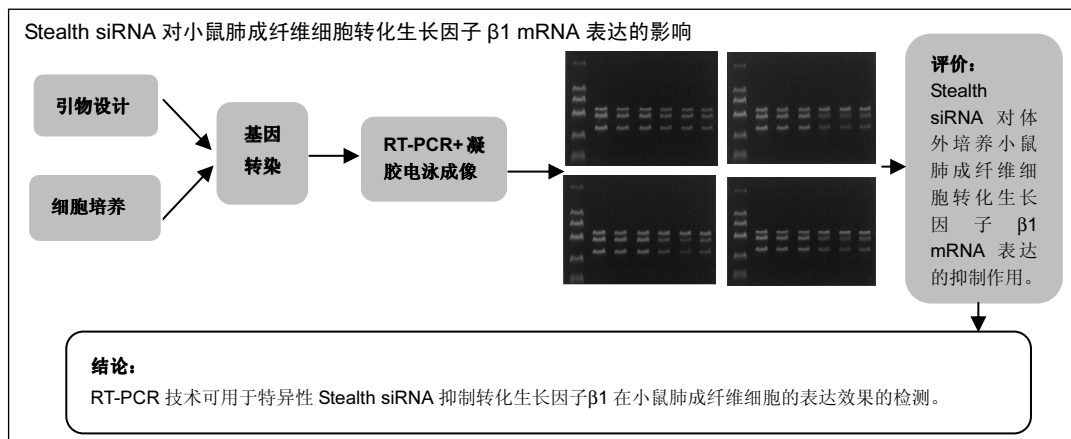
余维涛, 汪东剑, 艾凌艳(解放军第184医院, 江西省鹰潭市 335000)

引用本文: 余维涛, 汪东剑, 艾凌艳. RT-PCR联合凝胶电泳成像技术检测体外培养小鼠肺成纤维细胞转化生长因子 $\beta$ 1的表达[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(8):1268-1272.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.08.021

ORCID: 0000-0002-8803-8833(余维涛)

文章快速阅读:



余维涛, 男, 1976年生, 江西省乐平市人, 汉族, 2007年解放军第三军医大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事呼吸内科疾病、肺纤维化研究。

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2017)08-01268-05

稿件接受: 2016-12-21

文题释义:

**RT-PCR技术:** 即反转录PCR技术, 是将RNA的反转录和cDNA的聚合酶链反应相结合的技术。该技术灵敏度高, 用途广泛, 常用于检测细胞组织中基因表达水平、细胞中RNA病毒的含量和直接克隆特定基因的cDNA序列等。

**成纤维细胞:** 是疏松结缔组织的主要细胞成分, 由胚胎时期的间充质细胞分化而来。成纤维细胞较大, 轮廓清楚, 多为突起的纺锤形或星形的扁平状结构, 其细胞核呈规则的卵圆形, 核仁大而明显。根据不同功能活动状态, 可将细胞划分为成纤维细胞和纤维细胞, 成纤维细胞功能活动旺盛, 细胞质嗜弱碱性, 具明显的蛋白质合成和分泌活动, 在一定条件下, 它可以实现跟纤维细胞的互相转化。成纤维细胞对不同程度的细胞变性、坏死和组织缺损以及骨创伤的修复有着十分重要的作用。

摘要

**背景:** RT-PCR技术是将RNA的反转录和cDNA的聚合酶链反应相结合的技术。常用于检测细胞组织中基因表达水平、细胞中RNA病毒的含量和直接克隆特定基因的cDNA序列等。

**目的:** 运用RT-PCR技术检测Stealth siRNA对转化生长因子 $\beta$ 1的抑制作用。

**方法:** 实验分为空白对照组、空转染组、stealth\_48组、stealth\_166组和stealth\_594组。针对BALB/c小鼠转化生长因子 $\beta$ 1基因组, 选择不同位点设计3套siRNA基因序列, 转染体外培养的小鼠肺成纤维细胞, RT-PCR法检测其对转化生长因子 $\beta$ 1和下游结缔组织生长因子表达的影响。

**结果与结论:** ①RT-PCR结果显示3种Stealth siRNA对转化生长因子 $\beta$ 1表达在不同时间有不同程度的抑制作用, 以Stealth\_166效果更为明显; 抑制效果与转染时间长短相关, 48 h后就可检测出明显抑制, 72 h达到最高峰, 96 h后开始减弱; ②结果说明, RT-PCR技术可用于特异性Stealth siRNA抑制转化生长因子 $\beta$ 1在小鼠肺成纤维细胞的表达效果的检测。

**关键词:**

组织构建; 组织工程; 转化生长因子 $\beta$ 1; Stealth siRNA; 肺成纤维细胞; 抑制

**主题词:**

RNA, 小分子干扰; 转化生长因子 $\beta$ 1; 成纤维细胞; 组织工程

**基金资助:**

南京军区医药卫生科研基金资助项目(07M057)

**Combined use of RT-PCR and gel electrophoresis to detect expression of transforming growth factor beta1 in mouse lung fibroblasts *in vitro***

Yu Wei-tao, Wang Dong-jian, Ai Ling-yan (the 184<sup>th</sup> Hospital of PLA, Yingtan 335000, Jiangxi Province, China)

Yu Wei-tao, Master, Associate chief physician, the 184<sup>th</sup> Hospital of PLA, Yingtan 335000, Jiangxi Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** As a combination of reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR), RT-PCR has been used to detect gene expression levels in cells and tissues, RNA virus contents in cells and specific gene cloned cDNA sequences.

**OBJECTIVE:** To detect the inhibitory effect of Stealth siRNAs on the expression of transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ).

**METHODS:** There were blank control, empty vector transfection, stealth\_48, stealth\_166, and stealth\_594 groups. Three stealth siRNAs aimed at different sequences in TGF- $\beta 1$  mRNA were made, and were then transfected into BALB/c mouse lung fibroblasts *in vitro*. The expressions of TGF- $\beta 1$  and connective tissue growth factor were detected by RT-PCR.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In different time periods, the TGF- $\beta 1$  expression was differentially depressed by three stealth siRNAs, especially stealth\_166. The inhibitory effects varied with time, which could be detected at 48 hours, reached the peak at 72 hours and then began to attenuate at 96 hours. Our findings show that the inhibitory effect of stealth siRNAs on the TGF- $\beta 1$  expression in mouse lung fibroblasts can be detected by RT-PCR.

**Subject headings:** RNA, Small Interfering; Transforming Growth Factor beta1; Fibroblasts; Tissue Engineering

**Funding:** the Medicine Health Research Foundation of Nanjing Military Region, No. 07M057

**Cite this article:** Yu WT, Wang DJ, Ai LY. Combined use of RT-PCR and gel electrophoresis to detect expression of transforming growth factor beta1 in mouse lung fibroblasts *in vitro*. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(8):1268-1272.

## 0 引言 Introduction

有研究证实肺间质纤维化的发生发展与转化生长因子 $\beta 1$ 的高表达密切相关<sup>[1-2]</sup>。常运用针对性小干扰RNA(small interference RNA, siRNA), 诱导产生特异性内源或外源性靶基因沉默, 介导其互补同源mRNA序列特异性降解, 从而抑制靶基因的转录后表达来进行基因功能研究。针对转化生长因子 $\beta 1$ 的mRNA序列, 选择3个基因位点设计并合成正义链经化学修饰的siRNA(Stealth siRNA), 通过脂质体转染小鼠肺成纤维细胞(lung fibroblast, LfB), 对转化生长因子 $\beta 1$ 表达有抑制作用<sup>[3]</sup>。研究Stealth siRNA 对转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响, 首先要选择适合的转化生长因子 $\beta 1$ 检测方法, ELISA法和放射免疫分析常用于血清转化生长因子 $\beta 1$ 的检测<sup>[4-5]</sup>, 而对于细胞组织中的转化生长因子 $\beta 1$ 检测, 目前常用的是免疫组织化学法<sup>[6-7]</sup>。免疫组织化学法作为定性实验, 在临床运用中, 特别是在效果评价方面具有一定的缺陷。RT-PCR技术被广泛的运用于miRNA的表达分析<sup>[8-9]</sup>, 为此, 作者将RT-PCR联合凝胶电泳成像技术运用到实验中, 用以评价Stealth siRNA对体外培养小鼠肺成纤维细胞转化生长因子 $\beta 1$  mRNA表达的抑制作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于2006年1月至10月在解放军第三军医大学第三附属医院中心实验室完成。

1.3 材料

**实验动物:** 清洁级新生BALB/c小鼠, 雌雄不限, 由解放军第三军医大学第三附属医院中心实验室提供。

**主要仪器和试剂:** PCR扩增仪(英国Hybaid公司), 可见光/紫外凝胶扫描分析系统(美国UVP公司); DMEM细胞培养基/液、胎牛血清购自Gibco公司, Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司, 胰蛋白酶、DMSO购自Amresco公司, 波形蛋白抗体、转化生长因子 $\beta 1$ 免疫组织化学试剂

盒购自武汉博士德公司, RNA提取试剂盒购自上海生物工程有限公司。

### 1.4 实验方法

1.4.1 设计与制备特异性Stealth siRNA 在GENBANK网站查得BALB/c小鼠转化生长因子 $\beta 1$ 的mRNA序列; 应用Invitrogen公司网站的在线设计软件BLOCK-iT™ RNAi Designer, 选择stealth\_48、stealth\_166、stealth\_594等3个位点, 分别靶向设计得到3套Stealth siRNA序列, 交由invitrogen公司合成Stealth siRNAs。选择基因位点遵循以下原则: ①避开5'和3'端的非编码区; ②选择G/C比在35%–55%之间的序列; ③使用BLAST排除和其他编码序列/EST同源序列。

1.4.2 细胞培养及鉴定 取出清洁级新生BALB/c小鼠的肺组织, 剪成0.5–1.0 mm<sup>3</sup>的小组织块, 按组织块法进行细胞原代培养肺成纤维细胞, 并纯化、传代<sup>[10]</sup>。对纯化后的细胞, 锥虫蓝染色计数活细胞率, 苏木精-伊红染色观察细胞形态学特征, 波形蛋白免疫组织化学检测以鉴定肺成纤维细胞。冻存第4代细胞用于实验。

1.4.3 基因转染 将培养好的第4代肺成纤维细胞消化收集, 重悬于含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液中并计数, 按每孔0.4 mL( $2 \times 10^5$ /孔)分至24孔板继续培养24 h至细胞汇合度达90%左右。分为空白对照组、空转染组、stealth\_48组、stealth\_166组和stealth\_594组(4孔/组)。① Stealth siRNA稀释液配制: 用3 mL不含血清的Opti-MEM® I培养液分别稀释3种Stealth siRNA各20 nmol至20 mol/L, 轻轻混匀; ② Lipofectamine™ 2000稀释: 用5 mL不含血清的Opti-MEM® I培养液与0.1 mL Lipofectamine™ 2000轻轻混匀, 室温孵育5 min; ③复合物形成: 将稀释后的Stealth siRNA和Lipofectamine™ 2000在30 min内等量(50  $\mu$ L : 50  $\mu$ L)混合, 室温孵育20 min; ④培养: 按100  $\mu$ L/孔将复合物直接加入培养板中, 轻轻混匀后转入37 °C、体积分数5%的CO<sub>2</sub>培养箱内培养。

1.4.4 检测指标 分别消化收集24, 48, 72, 96 h的铺板细胞, 提取细胞总RNA, 反转录和PCR扩增; 收集最终产物进行凝胶电泳和成像。用凝胶成像仪图像分析软件进行图像分析, 半定量分析每种检测基因(转化生长因子β1和结缔组织生长因子)与内参照(β-actin)的A值之比(目的条带A值/内参条带A值)。

1.5 主要观察指标 ①小鼠肺成纤维细胞的鉴定; ②小鼠肺成纤维细胞转化生长因子β1表达。

1.6 统计学分析 应用SPSS 18.0软件对A值之比进行方差齐性检验后, 再进行单因素方差检验。

## 2 结果 Results

2.1 小鼠肺成纤维细胞的鉴定 通过苏木精-伊红染色及免疫组织化学分析, 培养细胞符合成纤维细胞的特性: ①光学显微镜下见细胞呈长梭形或多边形, 平行排列生长, 胞浆红染, 胞核蓝染, 其内可见两三个蓝色深染的核仁; ②细胞波形蛋白免疫组织化学染色阳性, 胞浆呈棕色。

2.2 Stealth siRNA序列设计 应用软件BLOCK-IT™ RNAi Designer设计得到3套Stealth siRNA序列, 见表1。

表1 Stealth siRNA序列

Table 1 Sequences of stealth siRNAs

Stealth siRNA 序列	序列 5'to3'
stealth_48 正义链	UAU CAA UGA UAG CAA CAA GAG GAU G
stealth_48 反义链	CAU CCU CUU GUU GCU AUC AUU GAU A
stealth_166 正义链	AUA AGG UGG UCU CGA UGA UUU CUG G
stealth_166 反义链	CCA GAA AUC AUC GAG ACC ACC UUA U
stealth_594 正义链	UUG CCA GGU GCA CAA AUC UGG AUU C
stealth_594 反义链	GAA UCC AGA UUU GUG CAC CUG GCAA
stealth_control 正义链	CCA AAG ACA UCU CAC ACA GUA UAU A
stealth_control 反义链	UAU AUA CUG UGU GAG AUG UCU UUG G

2.3 对小鼠肺成纤维细胞转化生长因子β1表达的影响的检测 经过RT-PCR后, 收集产物进行凝胶电泳成像(图1 A-E)分析, 比较各组转化生长因子β1与β-actin的A值之比。结果显示Stealth siRNA对转化生长因子β1表达的具有显著抑制作用, 并存在一定的时效性: ①转染24 h后, 各组间比值基本相同, 无明显差异; ②转染48 h后, Stealth siRNAs组的比值较各对照组减低, 有显著性差异( $P < 0.05$ ), Stealth siRNAs组间比较无显著差异; ③转染72 h后, Stealth siRNAs组的比值较各对照组明显减低, 有特别显著性差异( $P < 0.01$ ), 不同Stealth siRNA减低程度不同, 但组间比较无显著差异; ④转染96 h后, Stealth siRNAs组的比值较各对照组减低, 但减低程度小于72 h时相点, 数据比较与对照组间存在显著性差异( $P < 0.05$ ), Stealth siRNAs组间比较无显著差异, 具体见表2。

## 3 讨论 Discussion

转化生长因子β1是由淋巴细胞和单核细胞产生的一类

表2 转染后各组肺成纤维细胞不同时间转化生长因子β1的mRNA表达 (与β-actin的A值之比)

Table 2 Expression of transforming growth factor β1 mRNA in lung fibroblasts at different time points after transfection (compared with the absorbance value of β-actin)

组别	转化生长因子β1			
	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	1.00±0.10	1.00±0.04	1.00±0.12	1.00±0.06
空转染组	0.99±0.13	0.97±0.05	0.98±0.07	0.98±0.14
Stealth_对照组	0.97±0.05	0.97±0.12	0.99±0.11	0.96±0.03
Stealth_48 转染组	0.98±0.12	0.60±0.13 <sup>a</sup>	0.32±0.11 <sup>b</sup>	0.41±0.04 <sup>a</sup>
Stealth_166 转染组	0.96±0.14	0.57±0.10 <sup>a</sup>	0.25±0.10 <sup>b</sup>	0.38±0.10 <sup>a</sup>
Stealth_594 转染组	0.97±0.09	0.61±0.12 <sup>a</sup>	0.31±0.10 <sup>b</sup>	0.45±0.11 <sup>a</sup>

表注: 与空白对照组、空转染组、Stealth\_对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

具有多种生物活性的同源二聚体多肽分子, 相对分子质量约 $25 \times 10^3$ , 每条多肽链含110-140个氨基酸残基; 是多功能细胞因子超家族成员之一, 能刺激或抑制多种细胞的增殖, 其中提高细胞外基质是其最主要的功能, 亦是基底膜增厚、细胞外基质聚积和多种组织器官纤维化的关键因子<sup>[11-12]</sup>。转化生长因子β1在肺纤维化过程中主要作用于胶原的转录和翻译过程, 诱导前胶原mRNA的产生, 促进胶原蛋白的形成和沉淀, 因而在促进肺纤维化中起着重要作用<sup>[13-20]</sup>, 抑制转化生长因子β1有助于延缓肺纤维化的进程, 但常规药物如干扰素、苏拉明等对其抑制效率不高, 且安全性及给药途径等还有待于临床验证<sup>[21]</sup>。长21-23核苷酸的siRNA能避免非特异性抑制基因表达, 诱发特异性RNAi现象为了提供抑制转化生长因子β1表达<sup>[22-23]</sup>, 从而缓解肺纤维化进程的可能性<sup>[24-33]</sup>。因而作者针对小鼠的转化生长因子β1基因靶序列选择了3个位点分别设计了3种Stealth siRNA, 并对其中的正义链进行了化学修饰, 从而使其: ①只允许反义片段导入靶细胞/组织, 因而消除了正义链的RNA干扰作用, 这也大大降低了非特异性基因抑制的可能性; ②结构较以往的siRNA具有更好的稳定性, 不易被降解, 可保持活性达48 h以上。用于检验其对转化生长因子β1表达的抑制作用。

常规的ELISA法适用于血清样本的检测, 用于组织或者细胞检测时, 操作复杂, 繁琐, 可操作性差<sup>[34]</sup>; 免疫组织化学法仅能进行定性检测。作者采用RT-PCR技术联合凝胶电泳成像技术以检测转染3种Stealth siRNA对小鼠成纤维细胞转化生长因子β1表达的影响。通过实验得出3种Stealth siRNA对小鼠肺成纤维细胞中转化生长因子β1的表达均有不同程度的抑制作用, 其中Stealth\_166的抑制相对更为明显, 但3组转染组间比较并无统计学差异; 在不同的时段, 抑制效应也不尽相同, 转染24 h后并不能检测到表达减低, 48 h后各转染组小鼠肺成纤维细胞中转化生长因子β1的表达出现不同程度的减低, 72 h后表达减低最为明显, 但转染96 h后则抑制效应开始减弱; 同时, 下游因子结缔组织生长因子的表达也呈相关性变化。

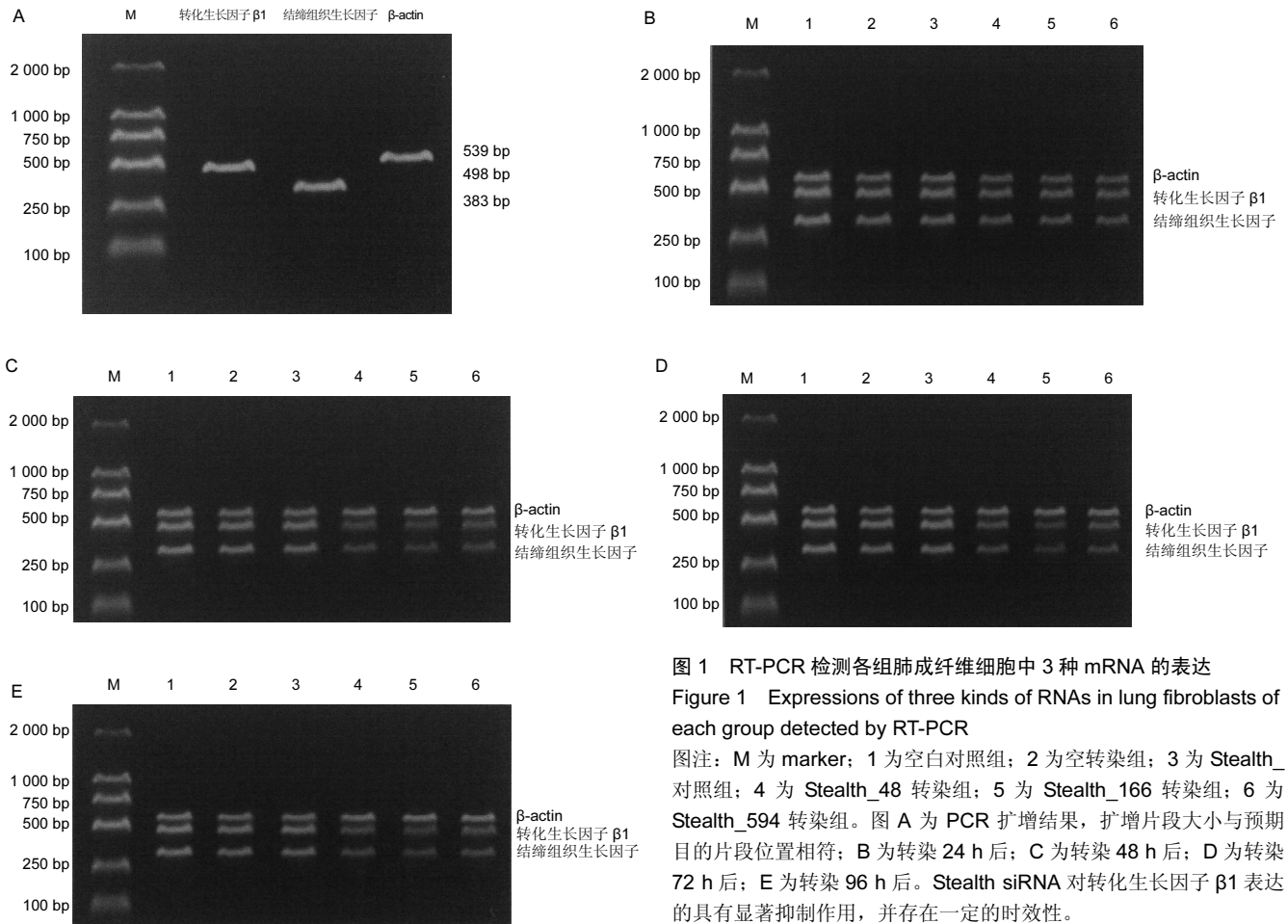


图 1 RT-PCR 检测各组肺成纤维细胞中 3 种 mRNA 的表达

Figure 1 Expressions of three kinds of RNAs in lung fibroblasts of each group detected by RT-PCR

图注: M 为 marker; 1 为空白对照组; 2 为空白转染组; 3 为 Stealth\_对照组; 4 为 Stealth\_48 转染组; 5 为 Stealth\_166 转染组; 6 为 Stealth\_594 转染组。图 A 为 PCR 扩增结果, 扩增片段大小与预期目的片段位置相符; B 为转染 24 h 后; C 为转染 48 h 后; D 为转染 72 h 后; E 为转染 96 h 后。Stealth siRNA 对转化生长因子  $\beta 1$  表达的具有显著抑制作用, 并存在一定的时效性。

RT-PCR 技术联合凝胶电泳成像技术能直观地显示 Stealth siRNA 对体外培养小鼠成纤维细胞转化生长因子  $\beta 1$  表达的抑制效应, 且灵敏度、特异性均高于 ELISA 法。由于凝胶电泳成像技术配合相应软件可以进行半定量分析, 较之只能进行定性实验的免疫组织化学技术更具备优势。作者认为 RT-PCR 技术联合凝胶电泳成像技术在医疗和科研工作中具有一定的实用性, 具有一定的推广价值。当然 RT-PCR 技术联合凝胶电泳成像技术也有不足之处, 操作过程较为繁琐, 使用仪器设备较多, 同时仅能进行半定量分析, 使其在临床上的运用受到了一定的制约。作者考虑设计针对转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 的特异探针, 采用适时荧光定量分析的方法, 建立适合于转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 检测的 PCR 反应体系, 以期完善组织及细胞样本中转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 表达检测的方案。

**作者贡献:** 余维涛参与实验设计、实施及评估全过程, 盲法评估, 汪东剑、艾凌艳参与实验的实施。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Selman M, King TE Jr, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: progress in understanding its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 2001;134:136-151.
- [2] Scaffidi AK, Petrovic N, Moodley YP, et al.  $\alpha(v)\beta(3)$  Integrin interacts with the transforming growth factor- $\beta$  type II receptor to potentiate the proliferative effects of TGF- $\beta$ 1 in living human lung fibroblasts. *J Biol Chem.* 2004;279(36): 37726-37733.
- [3] 余维涛, 崔社怀, 杨雪梅. 特异性 stealth siRNA 抑制小鼠肺成纤维细胞 TGF- $\beta$ 1 表达的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(21):2038-2040.
- [4] 孟翠萍, 罗武, 陈灵. ACEI 联合激素治疗肾病综合征疗效及 TGF- $\beta$  1 检测的临床意义[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(2):297-299.
- [5] 厉琴, 刘畅, 樊荣等. 消化性溃疡患者血清 IL-2、IL-6 和 TGF- $\beta$ 1 检测的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2013, 26(2):143-144.

- [6] 董志珍,姚登福,沈预程等.肝细胞肝癌组织TGF- $\beta$ 和IGF-II异常表达与HBV复制[J].江苏医药,2008,34(7):649-651.
- [7] 叶军,薛冬英,张洁等.慢性肝炎肝纤维化患者肝组织和血清中TGF- $\beta 1$ 、TIMP-1检测及其意义[J].肝脏,2007,12(4):294-295.
- [8] Huang Y,Zou Q,Wang S P,et al.The discovery approaches and detection methods of microRNAs.Mol Biol Rep.2011; 38(6):463-472.
- [9] 党裔武,陈罡,容敏华.实时定量RT-PCR检测肝癌miRNA表达中内参的选择[J].临床与实验病理学杂志,2012,28(10):1102-1106.
- [10] 王珂,周长满,于恩华.成年大鼠嗅球和鼻腔嗅粘膜成鞘细胞的分离、培养与鉴定[J].解剖学报,2002, 33(5):488-491.
- [11] Qi W,Chen X,Poronnik P,et al.Transforming growth factor-beta/connective tissue growth factor axis in the kidney. Int J Biochen Cell Biol.2008;40(1):9-13.
- [12] 杨云华,艾维.慢性肾脏病与肾脏纤维化研究进展[J].实用医学杂志, 2009,25(20): 3357-3359.
- [13] Li HH, Cai Q, Wang YP,et al. The role of transforming growth factor- $\beta$ 1/connective tissue growth factor signaling pathway in paraquat-induced pulmonary fibrosis. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. 2016; 34(7):484-488.
- [14] Yao R, Cao Y, He YR, et al.Adiponectin attenuates lung fibroblasts activation and pulmonary fibrosis induced by paraquat.PLoS One. 2015;10(5):e0125169.
- [15] Hao S, Wang W, Yu Z, et al.[Adrenomedullin inhibits TGF- $\beta 1$ -induced procollagen expression in cultured human fetal lung fibroblasts via Smad2/3 pathway].Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 2014;30(11):1125-1128.
- [16] Estany S, Vicens-Zygmunt V, Llatjós R, et al.Lung fibrotic tenascin-C upregulation is associated with other extracellular matrix proteins and induced by TGF $\beta 1$ .BMC Pulm Med. 2014;14:120.
- [17] Zhang M, Cao SR, Zhang R, et al. The inhibitory effect of salvianolic acid B on TGF- $\beta 1$ -induced proliferation and differentiation in lung fibroblasts.Exp Lung Res. 2014;40(4): 172-185.
- [18] Xu X, Wan X, Geng J, et al.Kinase inhibitors fail to induce mesenchymal-epithelial transition in fibroblasts from fibrotic lung tissue.Int J Mol Med. 2013;32(2):430-438.
- [19] Mirzamani MS, Nourani MR, Imani Fooladi AA,et al. Increased expression of transforming growth factor- $\beta$  and receptors in primary human airway fibroblasts from chemical inhalation patients. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2013; 12(2):144-152.
- [20] Wójcik KA, Skoda M, Koczurkiewicz P, et al.Apigenin inhibits TGF- $\beta 1$  induced fibroblast-to-myofibroblast transition in human lung fibroblast populations.Pharmacol Rep. 2013; 65(1):164-172.
- [21] 高晓方,崔社怀.干扰素 $\gamma$ 对实验大鼠肺纤维化的治疗作用及机制的初步研究[J].第三军医大学学报, 2005, 27(2): 143-145.
- [22] Ruvkun G. Molecular biology: Glimpses of a tiny RNA world. Science. 2001,294:797-799.
- [23] Dillon CP, Sandy P, Nencioni A, et al. RNAi as an experimental and therapeutic tool to study and regulate physiological and disease processes. Annu Rev Physiol. 2005;67: 147-173.
- [24] Baarsma HA, Engelbertink LH, van Hees LJ, et al.Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) regulates TGF- $\beta$ 1-induced differentiation of pulmonary fibroblasts.Br J Pharmacol. 2013;169(3):590-603.
- [25] Shi Y, Dong Y, Duan Y,et al.Substrate stiffness influences TGF- $\beta 1$ -induced differentiation of bronchial fibroblasts into myofibroblasts in airway remodeling.Mol Med Rep.2013 ; 7(2):419-424.
- [26] Robinson PM, Blalock TD, Yuan R, et al.Hammerhead ribozyme-mediated knockdown of mRNA for fibrotic growth factors: transforming growth factor-beta 1 and connective tissue growth factor.Methods Mol Biol. 2012;820:117-132.
- [27] Ren DQ, Liu M, Guo YZ,et al. [Liver X receptor agonist T0901317 inhibits TGF- $\beta 1$ -induced  $\alpha$ -SMA expression in normal human lung fibroblasts].Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2011;31(5):744-748.
- [28] Zhang J, Wu L, Feng MX, et al.Pulmonary fibroblasts from COPD patients show an impaired response of elastin synthesis to TGF- $\beta 1$ .Respir Physiol Neurobiol. 2011;177(3): 236-240.
- [29] Fu JH, Yang HP, Pan L, et al. [Effects of TGF- $\beta 1$  on gene expression of connective tissue growth factor in lung fibroblasts].Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 2011;13(1): 36-39.
- [30] Ding H, Zhou FQ, Cai HR, et al. Expression of caveolin-1 and extracellular matrix induced by transforming growth factor beta1 in human fetal lung fibroblasts. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 2010;33(4):280-283.
- [31] Pegorier S, Campbell GA, Kay AB, et al. Bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-7 regulate differentially transforming growth factor (TGF)-beta1 in normal human lung fibroblasts (NHLF).Respir Res. 2010;11:85.
- [32] Sullivan DE, Ferris M, Nguyen H, et al.TNF-alpha induces TGF-beta1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation.J Cell Mol Med. 2009;13(8B): 1866-1876.
- [33] Shi JQ, Xie M, Wang YJ, et al. [The effect of rosiglitazone on signal pathways of transforming growth factor-beta1 in human lung fibroblast].Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2009; 40(4):598-603.
- [34] 应方微,黎明,李志.角膜营养不良家系患病角膜细胞角蛋白及b-FGF与TGF- $\beta 1$ 表达的研究[J].中国实用眼科杂志,2011,29(7): 731-734.