

半边旗二萜类化合物 5F 对人翼状胬肉成纤维细胞 结缔组织生长因子表达和胶原合成的影响

林意玲¹, 吴平², 廖海兰¹, 张培华³, 何惠娟², 江黎明⁴, 梁念慈⁴

(广东医学院 1.附属医院眼科; 2.附属医院中心实验室; 3.整形外科研究所;

4.生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524001)

摘要:【目的】观察半边旗二萜类化合物 5F(5F)对体外培养的人翼状胬肉成纤维细胞(HPF)增殖和胶原合成及结缔组织生长因子(CTGF)表达的影响。【方法】利用手术切除的人翼状胬肉组织进行原代细胞培养,即得到 HPF。将不同质量不同浓度(0、8、32、128) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 5F 作用于 HPF 24 h,通过噻唑蓝比色法(MTT)检测 5F 对细胞增殖的作用;用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质印迹(Western blot)检测 5F 对细胞中 CTGF mRNA 及蛋白表达水平的影响;用化学比色法检测 5F 对细胞胶原蛋白含量的影响。【结果】在 HPF 中加入不同质量浓度(0、8、32、128) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 5F 作用 24 h,各组剂量的 5F 均可以明显抑制 HPF 的增殖($P < 0.01$),其半数抑制率(IC_{50})为 32.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 8~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量范围内,5F 能显著地下调 CTGF mRNA(0.69 ± 0.05 , 0.38 ± 0.06 , 0.19 ± 0.04 ,与对照组 0.82 ± 0.09 比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)和 CTGF 蛋白(82.34 ± 5.16 , 31.46 ± 4.98 , 23.28 ± 2.65 ,与对照组 98.12 ± 7.20 比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)的表达水平,能显著地降低胶原蛋白的含量(13.95 ± 1.49 , 12.53 ± 0.51 , 5.89 ± 0.80 ,与对照组 16.19 ± 1.02 比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且均有明显的剂量-效应关系。【结论】半边旗二萜类化合物 5F 能显著地抑制体外培养的 HPF 的增殖和胶原蛋白的含量,使细胞的 CTGF mRNA 及蛋白表达明显下调,并且呈显著的量效关系,表明半边旗 5F 具有体外抗纤维化作用,这为寻找有效治疗 HPF 的药物提供了新的思路。

关键词:半边旗;二萜类;翼状胬肉;成纤维细胞;结缔组织生长因子;胶原

中图分类号: R282.71; R977.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0369-05

Effect of Diterpenoid Compound 5F from *Pteris Semipinnata* L. on Expression of Connective Tissue Growth Factor and Collagen Synthesis in Human Pterygium Fibroblasts

LIN Yi-ling¹, WU Ping², LIAO Hai-lan¹, ZHANG Pei-hua³, HE Hui-juan², JIANG Li-ming⁴, LIANG Nian-ci⁴

(1. Department of Ophthalmology, The Affiliated Hospital; 2. The Central Laboratory, The Affiliated Hospital; 3. The Institute of Reparative Surgery; 4. The Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: 【Objective】To observe the effect of diterpenoid compound 5F from *Pteris semipinnata* L. (5F) on the cell proliferation, collagen synthesis and the expression of connective tissues growth factor(CTGF) in human pterygium fibroblasts (HPF) cultured in vitro. 【Method】HPF used were primary cell culture with exairesis human pterygium tissues. HPF cells were treated with different mass concentrations (0, 8, 32, 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of 5F for 24 h. The effect of 5F on cell proliferation was measured by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide method. The expression of CTGF mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blot, and the content of collagen protein of cells were determined by chemistry chromatometry. 【Result】HPF cell proliferation was significant depressed ($P < 0.01$) after the cells were treated with 5F for 24 h (the IC_{50} was 32.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 5F in concentration range of 8~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ markedly inhibited the expression of both CTGF mRNA (0.69 ± 0.05 , 0.38 ± 0.06 , 0.19 ± 0.04 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$) and CTGF protein (82.34 ± 5.16 , 31.46 ± 4.98 , 23.28 ± 2.65 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the synthesis of collagen protein (13.95 ± 1.49 , 12.53 ± 0.51 , 5.89 ± 0.80 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$) of the cells and both showed the dependent relation with dose. 【Conclusion】A diterpenoid compound 5F from *Pteris semipinnata* L. could depress the cell proliferation and

收稿日期: 2005-12-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870900); 广东省科委重大科技攻关项目(9622007 002)

作者简介: 林意玲(1963-), 女, 广东吴川人, 副主任医师; 吴平, 导师, 通讯作者. E-mail: wping62@126.com

collagen synthesis, induce the down-regulation of the expression of CTGF mRNA and protein in HPF with the significant dose-effect relationship ($P < 0.05$). It shows that 5F have the function of antifibrosis in vitro, which provides new thought of finding effective drug for HPF.

Key words: *Pteris semipinnata* L.; diterpenoid; pterygium; fibroblasts; connective tissue growth factor; collagen

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):369-373]

人翼状胬肉是以成纤维细胞异常增殖、胶原大量合成、细胞外基质过度沉积为组织学特点的眼科较常见和多发的眼病之一。手术虽然能切除胬肉,但复发率较高,其确切的发病机制目前尚未完全清楚。近年来国内外的研究^[1-3]发现,结缔组织生长因子(connective tissues growth factor, CTGF)是转化生长因子(transforming growth factor, TGF- β)发挥生物效应的下游因子,对纤维细胞的分化增殖及细胞外基质的合成和降解具有很强的调控作用,其在各种类型的纤维化疾病中的过度异常表达可能是引起组织纤维化的重要机制之一。半边旗(*Pteris semipinnata* L.)是一种中草药,民间用于治疗蛇伤、外伤出血、抗菌痢和肝炎等。梁念慈发现^[4,5],半边旗中的有效成分二萜类化合物 5F[化学名为:11-羟基-15-氧-16-烯-对映贝壳杉烷-19-酸(ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid),简称 5F],具有显著的体内外抗肿瘤活性,并且毒副作用小,但目前它对翼状胬肉的治疗及细胞凋亡作用机制的研究尚鲜有报道。本研究用人翼状胬肉成纤维细胞(human pterygium body fibroblast, HPF)体外原代培养模型,选用不同浓度的半边旗 5F 对细胞作用的影响,并从基因和蛋白水平初步探讨半边旗 5F 对 HPF 的增殖和 CTGF 的影响及其可能的机制,以期为进一步寻找治疗 HPF 的有效药物提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

半边旗 5F 由广东医学院生物化学与分子生物学研究所梁念慈教授提供。Trizol、SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒、Tag DNA 聚合酶、Marker、DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) 培养基、胰蛋白酶均购自 GIBCO 公司,新生牛血清为杭州四季青生物制品公司产品,二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(Td-T-mediated Dntp end labeling[3-4, 5-dimethyl-

2-thiazolyl] 2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 均为 Sigma 公司产品。山羊抗人 CTGF 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;辣根酶标记兔抗山羊 IgG 购自北京中山生物技术有限公司;DAB system for western blot 试剂盒购自珠海百奥生物技术有限公司。

1.2 标本来源及细胞培养

培养组织取自本院眼科手术切除的原发性翼状胬肉标本,12 病例术前均未接受过药物治疗,组织块原代培养参考 Solomon 等^[6]的方法进行细胞原代及传代培养,经显微镜及细胞生物学鉴定,证实为成纤维细胞,实验选用第 4-9 代细胞。

1.3 噻唑蓝比色法(MTT)测定不同浓度 5F 对 HPF 增殖的影响

参照文献^[7]方法进行,取对数生长期的成纤维细胞用质量浓度 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化后,将细胞以 1×10^4 /L 密度接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μ L,于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5%的 CO₂ 孵箱中培养 24 h,更换体积分数 10%的 FBS DMEM 培养基并加入 5F,使药物终浓度分别为(0、8、16、32、64、128 μ g/mL,每一浓度重复 6 孔。孵箱培养 24 h 后,每孔加入 MTT(5 mg/mL) 20 μ L,继续培养 4 h,吸去培养液,每孔加入 DMSO 100 μ L,于微量振荡器上振荡 10 min,待紫色结晶完全溶解后,立即用酶联免疫测定仪(美国 BioRad550 型)测定 570 nm 处的吸光度值 A,求出增殖抑制率(inhibition rate, IR, %)。抑制率(IR) = (1 - 用药组 A 值/对照组 A 值) \times 100%。按改良 Karber 式计算半数抑制率(IC₅₀): $\lg IC_{50} = X_m - i [P - (3 - P_m - P_n) / 4]$,其中 $i = \lg$ (最大剂量/相邻剂量), $X_m = \lg$ 最大剂量, $P =$ 阳性反应率之和, $P_m =$ 最大阳性反应率, $P_n =$ 最小阳性反应率。

1.4 RT-PCR 检测 5F 对 HPF CTGF mRNA 表达的影响

用 PBS 洗涤实验各组细胞,在培养瓶中加 Trizol RNA 提取液提取细胞总 RNA。制备的细胞总 RNA 用紫外分光光度计测定读数 A_{260}/A_{280} 为 1.8 ~

2.0, 调整 RNA 浓度为 1 g/L 后即作 RT-PCR 反应。引物设计参考人 CTGF cDNA 序列, 进行特异性 CTGF 引物设计, 同时选用 β -actin 作为内参照。CTGF: 上游 5'-AAC TAT GAT TAG AGC CAA CTG CCT G-3', 下游 5'-TCA TGC CAT GTC TCC GTA CAT CTT C-3', 用这对引物可扩增出长度为 475 bp 的 CTGF cDNA 片段; β -actin: 上游 5'-CCG CGA GAA GAT GAC CCA GAT-3', 下游 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GA-3', 用这对引物可扩增出长度为 781 bp 的 β -actin cDNA 片段。引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。RT-PCR 反应采用 Gibco 公司提供的 RT-PCR 试剂盒按说明书严格进行操作, 细胞总 RNA 反应量均为 4 μ g, 总反应体积为 50 μ L。反应条件为: cDNA 的合成和预变性: 42 $^{\circ}$ C, 50 min, 94 $^{\circ}$ C 3 min; PCR 扩增: 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 共 28 个循环, 循环完毕后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物用质量浓度 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 稳压电泳 5 V/cm 约 1.5 h, 0.5 μ g/mL 溴乙锭染色 20 min 后, 紫外灯观察、拍照。在 UVP 凝胶成像系统中扫描, 并分析电泳带灰度。以特异性 CTGF 扩增带吸光度值 A 与 β -actin 扩增带吸光度值 A 之比半定量代表 CTGF mRNA 的表达水平。

1.5 Western blot 分析 HPF CTGF 蛋白的表达

将 10×10^5 细胞接种于 90 mm 培养皿, 培养 48 h, 待细胞生长至体积分数 90% 的融合状态后, 各实验组加入不同浓度的 5F 继续培养 24 h, 然后每组用预冷的 PBS 冲洗 2 次, 收集细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 100 μ L 裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 6.25 mmol/L Na₂S₂O₈, 100 μ g/mL PMSF, 体积分数 1% Triton X-100), 放置 20 min, 每个样品取 50 μ L 的蛋白质行 SDS-PAGE 电泳。制备 80 g/L 的聚丙烯酰胺分离胶, 50 g/L 的聚丙烯酰胺浓缩胶。在蛋白样品中加入等体积的加样缓冲液, 煮沸 5 min 后, 取 20 μ L 上样, 130 V 电压电泳; PVDF 膜电转移, 350 mA, 50 min。封闭缓冲液 (100 g/L 的脱脂奶粉, 体积分数 0.5% Tween-20, 6.25 mmol/L Na₂S₂O₈, pH 7.4), 作用 1 h; 加入稀释度为 1:100 的山羊抗人 CTGF 多克隆抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min; PBS + 体积分数 1% Tween 20 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入稀释度为 1:5 000 的辣根酶标记兔抗山羊 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBS + 体积分数 1% Tween 20 洗膜 3 次, 每次 10 min; 显色系统显色。拍照, 进行条带灰度扫

描, 分析电泳带灰度, 以 CTGF 的条带吸光度值 A 代表蛋白质含量。

1.6 半边旗 5F 对 HPF 胶原合成的影响

将细胞接种于 24 孔培养板, 细胞密度 5×10^4 孔, 每孔加入 1 mL 培养基。接种 48 h 后更换培养基, 同时加入不同浓度 5F, 每一浓度设计 4 个平行孔。药物作用 48 h, 从每孔各吸取 0.5 mL 培养基, 按羟脯氨酸检测试剂盒说明书方法测定培养基中羟脯氨酸的含量。用酶标仪 540 nm 检测 A 值, 样品中羟脯氨酸浓度 (μ g/mL) = 测定管 A 值 \pm 标准管浓度/标准液 A 值; 样品中胶原浓度 = 样品羟脯氨酸浓度 $\times 7.46$ \times 稀释倍数 (7.46 是从羟脯氨酸换算为胶原时的计算常数)。

1.7 统计学方法

用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较如果方差齐同, 采用单因素方差分析 (one-way-ANOVA), 两两比较采用最小显著差异法 (LSD 法) 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 半边旗 5F 对 HPF 增殖的抑制作用

不同浓度的半边旗 5F (0、8、16、32、64、128 μ g/mL) 分别处理细胞 24 h 后, 用 MTT 比色法检测其对细胞的增殖抑制率 (IR, %) 分别为 0, 13.24 ± 0.73 , 28.23 ± 0.81 , 47.63 ± 1.24 , 69.82 ± 1.31 , 88.93 ± 1.92 。在 8~128 μ g/mL 的剂量范围内, 5F 的抑制作用均有明显的剂量-效应关系。与对照组相比, 差异具有统计学意义 ($F=2646.1, P < 0.01$, 图 1)。5F 对细胞的半数抑制率 (IC_{50}) 为 32.12 μ g/mL。

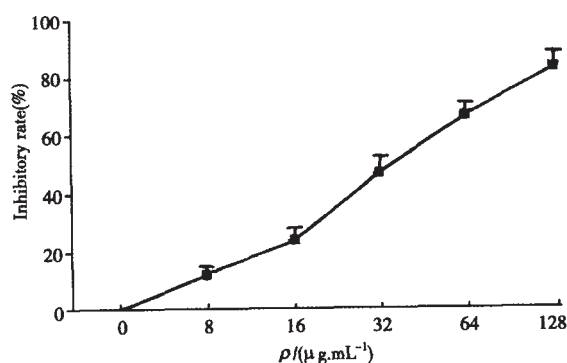


图 1 半边旗 5F 对 HPF 的生长抑制作用。

Fig.1 Inhibitory effect of Pteris semipinnata L. of 5F on HPF growth.

$n=6, \bar{x} \pm s$; vs control group, $P < 0.01$

2.2 5F 对 HPF CTGF mRNA 表达的作用

RT-PCR 产物电泳结果显示, 各组细胞 CTGF mRNA 在 475 bp 和 781 bp 位置上均出现特异性条带,与预期扩增片断的长度相符(图 2)。半边旗 5F 不同药物浓度组(0、8、32、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理细胞 24 h 后, 细胞 CTGF mRNA 表达量的相对吸光度值 A 为:0.82 \pm 0.09, 0.69 \pm 0.05, 0.38 \pm 0.06, 0.19 \pm 0.04。在 8~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量范围内,随着半边旗 5F 作用浓度的增加, 细胞的 CTGF mRNA 表达相对量逐渐减少(图 2), 与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照组相比, 差异均有统计学意义 ($F=62.6, P < 0.01$)。

2.3 半边旗 5F 对 HPF CTGF 蛋白质表达的作用

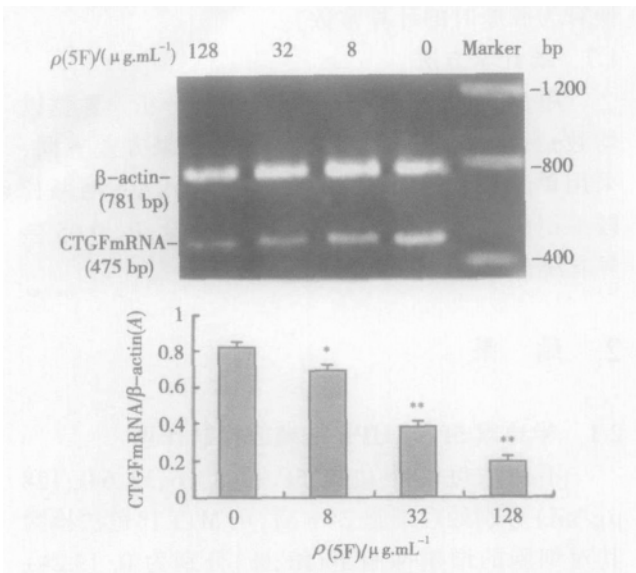


图 2 5F 对 HPF CTGF mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of 5F on CTGF mRNA expression

HPF were treated with 5F 0, 8, 32, 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Compared with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$

Western blot 结果如图 3 所示, 经半边旗 5F 0、8、32、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用 24 h 后, 细胞 CTGF 蛋白表达量的吸光度值 A 为:98.12 \pm 7.20, 82.34 \pm 5.16, 31.46 \pm 4.98, 23.28 \pm 2.65。在 8~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量范围内, 随着半边旗 5F 作用浓度的增加, 细胞的 CTGF 蛋白表达量逐渐减少(图 3), 与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照组相比, 差异均有统计学意义 ($F=149.0, P < 0.01$)。

2.4 半边旗 5F 对 HPF 胶原蛋白合成的作用

结果如表 1, 可见半边旗 5F 0、8、32、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对 HPF 胶原蛋白合成有显著的抑制作用, 随着用药浓度增加, 细胞的羟脯氨酸、胶原蛋白含量逐

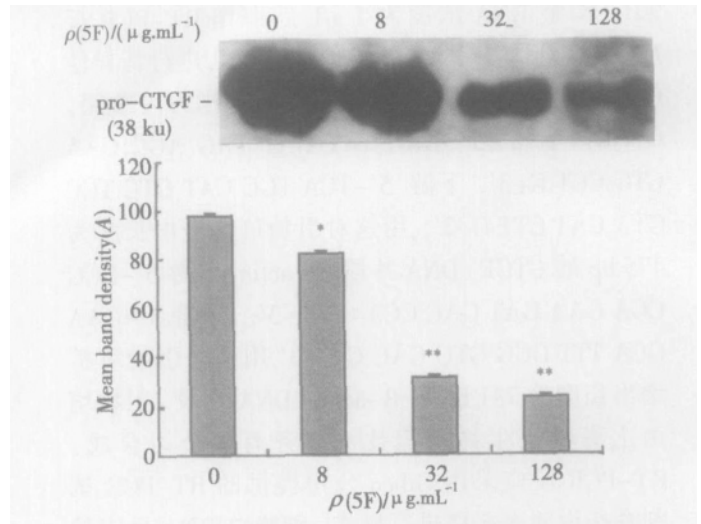


图 3 5F 对 HPF CTGF 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of 5F on CTGF protein expression

HPF were treated with 5F (0, 8, 32, 128) $\mu\text{g}/\text{mL}$

Compared with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$

渐减少, 胶原蛋白各组与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照组相比, 差异均有统计学意义 ($F=56.2, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 不同浓度半边旗 5F 对 HPF 胶原蛋白的影响

Table 1 Effects of Pteris semipinnata L. of 5F with different concentration on collagen in HPF (n=6, $\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g}/\text{mL}$)

ρ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Hydropridine	Collagen
0	2.17 \pm 0.13	16.19 \pm 1.02
8	1.87 \pm 0.16	13.95 \pm 1.49 ¹⁾
32	1.68 \pm 0.14	12.53 \pm 0.51 ²⁾
128	0.79 \pm 0.10	5.89 \pm 0.80 ²⁾

vs control group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

3 讨论

CTGF 最早从人脐静脉内皮细胞分离出来, 它是一种富含半胱氨酸的长度为 349 个氨基酸的多肽, 分子质量约为 36~38 ku, 是即刻早期基因 CCN (CTGF、Cef10、cyr61 和 Nov) 家族成员, 可由成纤维细胞、平滑肌细胞、部份血管内皮细胞和软骨细胞等分泌。研究发现, 在 CTGF 启动子序列 128~162 位置上存在着一个重要的 TGF 1 调控元件, 其点突变可以导致 TGF 1 活性完全丧失, 故认为 CTGF 是 TGF 1 致纤维化作用的直接下游效应介质^[9]。Igarashi 等^[9]用原位杂交方法先后发现在系统性和

局限性硬皮病皮损中均有 CTGF mRNA 的表达,而在同一患者正常皮肤或正常人对照组皮肤中则呈阴性。国内学者郭长梅等^[10]用免疫组化方法发现在增生性玻璃体视网膜病变增生膜中也有 CTGF 表达上调,表明 CTGF 参与了增生性玻璃体视网膜病变增生膜的形成和发展。

有研究表明敲除 TGF- β_1 基因的小鼠因失去对炎症的抑制而在出生后很快死于严重的全身性炎症^[11]。与 TGF- β_1 相比,在生理状态下 CTGF 主要在间质细胞中低水平表达,其作用范围也主要局限于结缔组织,因此在创伤修复或者纤维化过程中,CTGF 是一种特异性更强的、选择性干预结缔组织形成过程的靶细胞因子。阻断其表达可能更特异、更有效、更安全地治疗纤维化疾病。我们的实验研究表明,半边旗 5F 在一定浓度范围内可以抑制体外培养的 HPF 的增殖和胶原合成,当药物浓度高于 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞呈现抑制状态,随药物浓度增高,作用效果愈明显,药物浓度在 16~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与对照组相比,细胞抑制率呈显著性增加($P < 0.01$),验证半边旗 5F 对细胞呈剂量依赖性抑制。

为进一步证明半边旗 5F 抑制 HPF 胶原合成的作用是由于其有效抑制了 HPF 内 CTGF 的基因转录和蛋白合成,我们分别用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测了 HPF 中 CTGF mRNA 及蛋白的表达,结果表明,半边旗 5F 在一定浓度范围内(8~128) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可以使体外培养的 HPF 中 CTGF mRNA 及蛋白的表达水平下调,说明半边旗 5F 能从转录和翻译水平对 HPF 的抑制作用。这表明半边旗 5F 具有体外抗人翼状胬肉纤维化的作用。此发现为进一步探索其对人翼状胬肉纤维化的防治作用和作用机制提供了实验依据,并且提示半边旗 5F 有可能成为抗人翼状胬肉的可行药物。

作为祖国传统中药材的半边旗具有资源丰富、价格低廉等优点,因此其在治疗人翼状胬肉方面具有良好的应用前景,有望成为临床防治人翼状胬肉的有效药物。其具体确切的作用机制和疗效仍有待进一步深入的动物实验研究和临床验证。

参考文献:

[1] BRADHAM D M, IGARASHI A, POTTER R L, et al.

Connective tissue growth factor: a cystein- rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC- induced immediate early gene product CEF- 10 [J]. *J Cell Biol*, 1991,114(6): 1285- 1294.

- [2] ESSON D W, NEELAKANTAN A, IYER S A, et al. Expression of connective tissue growth factor after glaucoma filtration surgery in a rabbit model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(2): 485- 491.
- [3] 黄琼,胡燕华,张明昌,等.羊膜对角膜成纤维细胞 CTGF 表达及凋亡的影响[J].*眼科研究*, 2006, 24(2): 125- 128.
- [4] 张晓,崔燎,田中信寿,等.半边旗有效成分及抗肿瘤活性研究[J].*中国药学杂志*, 1997, 32(1): 37- 38.
- [5] 王京滨,梁念慈,莫丽儿.半边旗中二萜类化合物 5F 对 K562 细胞 MAPK 活性、表达的影响[J].*中国药理学通报*, 2002, 18(3): 294- 297.
- [6] SOLOMON A, LI D Q, LEE S B, et al. Regulation of collagenase, stromelysin, and urokinase - type plasminogen activator in primary pterygium body fibroblasts by inflammatory cytokines [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(8): 2154- 2163.
- [7] 李翠玲,崔正言,李淑贞.MTT 比色分析法的改良及初步应用[J].*上海免疫学杂志*, 1996, 16(5): 306- 307.
- [8] KUCICH U, ROSENBLOOM J C, HERRICK D J, et al. Signaling events required for transforming growth factor- stimulation of connective tissue growth factor expression by cultured human lung fibroblasts [J]. *Arch Bioch Bioph*, 2001, 395(1): 103- 112.
- [9] IGARASHI A, NASHIRO K, KIKUCHI K, et al. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders [J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 106(4): 729- 733.
- [10] 郭长梅,韩泉洪,赵俊宏,等.结缔组织生长因子在体外人视网膜色素上皮细胞损伤模型中的表达和促移行作用[J].*中华眼底病杂志*, 2005, 21(5): 306- 309.
- [11] GORELIK L, FLAVELL R A. Abrogation of TGF beta signaling in T cells leads to spontaneous T cells differentiation and autoimmune disease [J]. *Immunity*, 2000, 12(2): 171- 181.

(编辑 刘清海)