

· 基础研究 ·

洋金花总碱对 TGF- β_1 诱导的人肺腺癌细胞 A549 细胞 EMT 的影响王 真¹ 杨珺超¹ 谭晓丽² 吕 昕¹

摘要 **目的** 探讨洋金花总碱对人肺腺癌细胞株 A549 在体外经转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 诱导后发生上皮细胞间质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的作用。**方法** 将体外培养的 A549 细胞随机分为 5 组:空白对照组、TGF- β_1 组及低、中、高浓度药物组,分别作用 24、48、72 h 时,观察各组 A549 细胞形态变化,通过蛋白免疫印迹(Western blot)及实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)检测各组 A549 细胞人细胞角蛋白 19 (CK-19)及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达。**结果** TGF- β_1 组的细胞形态逐渐由鹅卵石状向梭形改变;低、中、高浓度药物组形态与 TGF- β_1 组相似;3 个浓度药物组细胞形态间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。Western blot 结果显示:与空白对照组比较,TGF- β_1 组 CK-19 表达下调, α -SMA 表达上调($P < 0.01$);与 TGF- β_1 组比较,低、中、高浓度药物组 CK-19 表达上调($P < 0.01$), α -SMA 表达有所抑制($P < 0.01$);3 个浓度药物组间比较,72 h 时的高浓度药物组 CK-19 表达上调($P < 0.01$), α -SMA 表达抑制($P < 0.01$)。Real-time PCR 结果显示:与 TGF- β_1 组比较,3 个浓度药物组细胞 CK-19 mRNA 表达增多; α -SMA mRNA 表达减少($P < 0.01$)。**结论** 洋金花总碱对 TGF- β_1 诱导的肺腺癌细胞 A549 EMT 形态改变无明显影响,能一定程度上逆转 A549 细胞 EMT 过程中特征性标记物 CK-19 及 α -SMA 的表达,使上皮标志物 CK-19 表达增多,间质细胞标志物 α -SMA 表达减少,且在作用 72 h 时的高浓度药物组最为明显,并呈浓度依赖性和时间依赖性。

关键词 洋金花总碱;上皮细胞间质化;A549 细胞

Effect of *Flos Daturae* Alkaloids on TGF- β_1 -induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Pulmonary Adenocarcinoma A549 Cells WANG Zhen¹, YANG Jun-chao¹, TAN Xiao-li², and LV Xin¹ 1 Department of Respiration, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006); 2 Department of Respiration, First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of *Flos Daturae* alkaloids (FDA) on TGF- β_1 -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human pulmonary adenocarcinoma A549 cells. **Methods** A549 cells *in vitro* cultured were randomly divided into 5 groups, i.e., the blank control group, the TGF- β_1 group, the low dose FDA group, the medium dose FDA group, and the high dose FDA group. The morphologies of A549 cells were observed. Expressions of cytokeratin (CK)-19 and α -smooth muscle actin (α -SMA) were detected by Western blot and real-time PCR at 24, 48, and 72 h, respectively. **Results** A549 cells in the TGF- β_1 group turned from cobblestone to spindle shape gradually. Those in low, medium and high dose FDA groups showed similar shapes to those of the TGF- β_1 group. There was no statistical difference in the morphology of A549 cells among the 3 dose FDA groups ($P > 0.05$). Western blot showed that, when compared with the blank control group, the expression of CK-19 was down-regulated, but the expression of alpha-SMA was up-regulated in the TGF- β_1 group ($P < 0.01$). Compared with the

基金项目:浙江省中医药科学研究基金计划项目(No. 2012ZB049)

作者单位:1. 浙江中医药大学附属第一医院呼吸科(杭州 310006);2. 浙江中医药大学第一临床医学院呼吸科(杭州 310053)

通讯作者:王 真, Tel:1360580386, E-mail: wangzhen610@sina.cn

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 11. 1340

TGF- β_1 group, the expression of CK-19 was up-regulated, but the expression of α -SMA was suppressed in low, medium and high dose FDA groups ($P < 0.01$). The CK-19 expression obviously increased, but the α -SMA expression was suppressed in high dose FDA group at 72 h ($P < 0.01$). Real-time PCR results showed, as compared with the TGF- β_1 group, the mRNA expression of CK-19 was increased, but the mRNA expression of α -SMA was reduced in low, medium and high dose FDA groups ($P < 0.01$). Conclusions FDA had no effect on EMT morphological changes of TGF- β_1 induced A549 cells. FDA could reverse characteristic markers of A549 cells during EMT to some extent, such as expressions of CK-19 and α -SMA. The expression of CK-19 (as the epithelium marker) increased and the expression of α -SMA (as the mesenchymal marker) was reduced. Besides, they were most obviously seen in the high dose FDA group at 72 h in a dose- and time-dependent manner.

KEYWORDS *Flos Datuarae* alkaloids; epithelial-mesenchymal transition; A549 cell

肺泡上皮细胞向间质细胞转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肺纤维化的重要病理生理机制之一^[1],主要表现为上皮细胞标记物的缺失,间质细胞标记的获得,细胞形态的改变及迁移能力增加。有研究表明,在众多参与肺纤维化的 EMT 的细胞因子中,转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)起着关键作用^[2]。细胞角蛋白(cytokeratin, CK)来源于上皮组织,在间质组织中较少表达,其中 CK-19 特异性较高,最常用于标志表示上皮细胞。 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)是肌成纤维细胞特征性标志物,其程度增高可反映出肺纤维化严重程度^[3]。

洋金花总生物碱是来源于茄科曼陀罗属植物洋金花的提取物,现代药理研究发现,其有效成分为莨菪烷型生物碱^[4],表现为抑制毒蕈碱样作用,而有实验证实, M 受体阻滞剂噻托溴胺能浓度依赖性抑制乙酰胆碱、TGF- β_1 诱导的成纤维细胞的增殖作用^[5]。因此本实验采用 TGF- β_1 诱导肺腺癌细胞 A549 建立体外 EMT 模型,旨在探讨洋金花总碱在 TGF- β_1 体外诱导 A549 细胞 EMT 中的作用。

材料与方法

1 细胞株 肺腺癌细胞株 A549,购自中国医学科学院基础研究所细胞库。

2 药物 洋金花总碱(来源于浙江中医药大学药学院);精密称定洋金花总碱粉末 0.7 g,加入乙醇 50 mL 溶解为 14 mg/mL 的浓度备用。临用前加入新鲜的含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液混合至 5 mL,配制成 50 μ g/mL, 100 μ g/mL 和 200 μ g/mL 的药物浓度(浓度梯度由前期预实验 MTT 法得出)。

3 主要试剂 胎牛血清(美国 Hyclone 公司);

TGF- β_1 (美国 PeproTech 公司); Ham's F12 培养基,高糖 DMEM 培养基(美国 Life Technologies 公司); CK-19 兔抗人一抗(美国 Epitomics 公司);兔抗人 α -SMA 单克隆抗体(美国 Epitomics 公司); GAPDH 单克隆抗体(杭州达文生物有限公司);辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(杭州达文生物有限公司); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液($5 \times$)、BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。Trizol Reagent(美国 Invitrogen 生命技术有限公司); Prime Script RT Master Mix 试剂盒, DEPC 水(TaKaRa,大连宝生物工程公司)。

4 主要仪器 超净工作台;二氧化碳培养箱(美国 Forma Scientific 公司);倒置相差显微镜(美国 Thermo Fisher Scientific);高速台式离心机(美国 Thermo Fisher Scientific);高压蒸汽消毒柜(日本 SANYO 公司);电泳仪(美国 Bio Tek 有限公司);凝胶成像与分析系统(美国 Bio Tek 有限公司);PCR 仪(德国 Eppendorf 生物技术公司)。

5 方法

5.1 肺腺癌细胞株 A549 的培养 先常规传代于含 10% 胎牛血清 Ham's F12 培养基中,逐渐过渡至含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 及饱和湿度条件孵箱中培养,用 0.25% 胰酶-EDTA 消化,传代,取增殖旺盛,生长状态良好的细胞用于实验研究。

5.2 细胞分组和处理 当细胞生长融合至 70%~80%,用无血清培养基饥饿 24 h 使细胞静止于同步期,随机将细胞分为 5 组,分别为空白对照组、TGF- β_1 组(5 ng/mL)及低浓度药物组(50 μ g/mL 加 5 ng/mL TGF- β_1)、中浓度药物组(100 μ g/mL 加 5 ng/mL TGF- β_1)和高浓度药物组(200 μ g/mL 加 5 ng/mL TGF- β_1),分别作用 24、48、72 h。

5.3 观察项目及检测方法

5.3.1 细胞形态学变化 用不同浓度的洋金花总碱分别作用于细胞 24、48、72 h 时,通过倒置显微镜观察各组的细胞形态变化结果,并拍照记录。

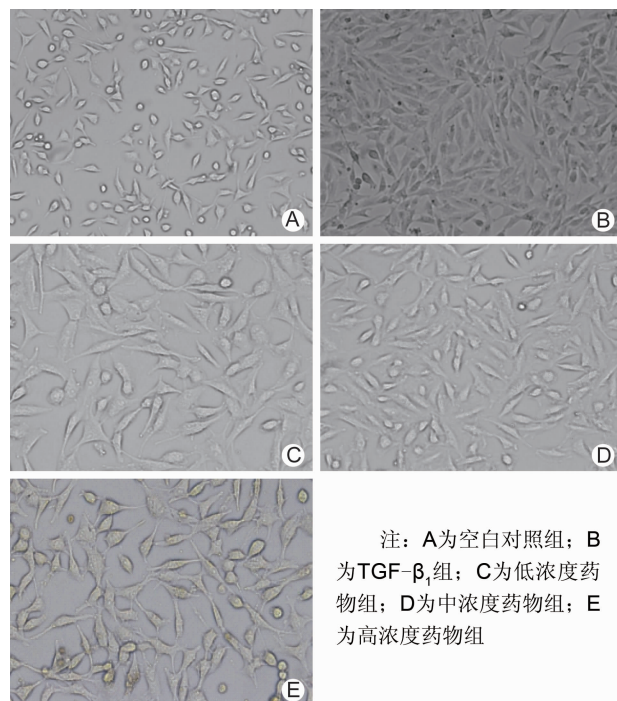
5.3.2 细胞内 CK-19、 α -SMA 蛋白表达 采用 Western blot 法检测。分别在低、中、高浓度洋金花总碱作用细胞 24、48、72 h 的时间点收集各组细胞,按试剂盒说明书提取细胞总蛋白:弃培养液,加入细胞蛋白裂解液,BCA 试剂盒蛋白定量。各组标本加入蛋白上样缓冲液行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜上,脱脂奶粉室温封闭 1 h,兔抗人(一抗)4 ℃ 孵育过夜,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(二抗)室温 2 h,ECL 发光显色,采用凝胶成像系统成像,利用图像分析软件进行分析,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白与内参灰度的相对比值。实验重复 3 次。

5.3.3 细胞内 CK-19、 α -SMA mRNA 表达 采用 Real-time PCR 法检测。分别在低、中、高浓度洋金花总碱作用细胞 24、48、72 h 的时间点收集各组细胞,进行以下处理:总 RNA 提取:按说明书,用 Trizol 法分别提取各组 A549 细胞总 RNA,并计算总 RNA 浓度,-20 ℃ 保存备用。逆转录合成 cDNA:加入 5 倍 PrimeScript RT Master Mix 配置成 10 μ L 的逆转录液,操作在冰上进行,在逆转录仪上设置程序:37 ℃,15 min;85 ℃,5 s;4 ℃,5 min,反应所得即为 cDNA。Real-time PCR 扩增反应:按说明书配置每份 10 μ L 的反应体系,合成 CK-19、 α -SMA 和 GAPDH 的 3 对引物分别为:CK-19,上游引物 5'-CATGAAAGCTGCCTTGGAA-3',下游引物 5'-CCTGATTCTGCCGCTCACTATC-3'(143 bp); α -SMA:上游引物 5'-AAGAGGAAGACAGCACAGC TC-3',下游引物 5'-GATGGATGGGAAAACAGCC-3'(187 bp);GAPDH:上游引物 5'-GGTCTCCTCTGACTTCAACA-3',下游引物 5'-AGCCAA-TTCGTTGT-CATAC-3'(115 bp),在 PCR 仪上进行扩增反应,反应条件:95 ℃ 30s 1 个循环;95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,40 个循环;95 ℃ 15 s 1 个循环;60 ℃ 1 min 1 个循环及 95 ℃ 15 s 1 个循环。所得的 RQ 值即为目的基因与内参的相对比值。实验重复 3 次。

5.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并予方差齐性检验,多组均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,方差不齐时组间比较采用 Tamhane's T2 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组细胞形态学观察(图 1) 与空白对照组比较,TGF- β_1 组的细胞形态由立方体、鹅卵石状上皮形态变为梭形、纺锤形,类似成纤维细胞形态,细胞外形伸长,并与周围细胞分离,细胞之间的连接变的松散,间隙增大;低、中、高浓度药物组的细胞形态类似于 TGF- β_1 组,3 个浓度组间比较,细胞形态差异不明显。

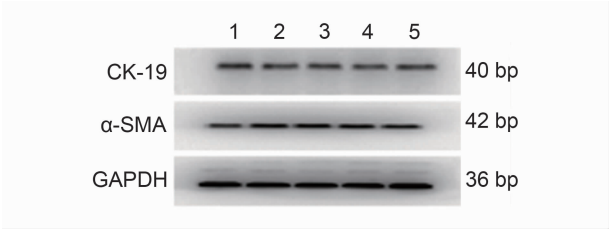


注: A 为空白对照组; B 为 TGF- β_1 组; C 为低浓度药物组; D 为中浓度药物组; E 为高浓度药物组

图 1 各组 TGF- β_1 诱导 24 h 时细胞形态变化比较
(荧光染色, $\times 100$)

2 各组 24、48、72 h CK-19、 α -SMA 蛋白表达比较(图 2-4,表 1) 在 24、48、72 h 时间点,与空白对照组比较,TGF- β_1 组 CK-19 表达明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 TGF- β_1 组比较,低浓度药物组 24、48、72 h α -SMA 表达均明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),中、高浓度药物组 24、48、72 h 时间点 α -SMA 表达差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 TGF- β_1 组比较,低浓度药物组及中浓度药物组 24 h 时 CK-19 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),中浓度药物组 48、72 h 时及高浓度药物组 CK-19 表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与低浓度药物组比较,作用 24 h 时,中浓度药物组 CK-19、 α -SMA 表达差异均无统计学意义($P > 0.05$),但作用 48、72 h 时,中浓度药物组 CK-19 表达明显增加($P < 0.01$), α -SMA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),而

高浓度药物组在 3 个时间点 CK-19 表达均明显增加 ($P < 0.01$), α -SMA 表达抑制 ($P < 0.01$)。与中浓度药物组比较, 在 24、48、72 h 3 个时间点, 高浓度药物组 CK-19 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), α -SMA 表达有所下降 ($P < 0.05$)。



注:1 为空白对照组;2 为 TGF- β_1 组;3 为低浓度药物组;4 为中浓度药物组;5 为高浓度药物组;图 3、4 同

图 2 各组细胞 24 h 时 CK-19、 α -SMA 蛋白表达

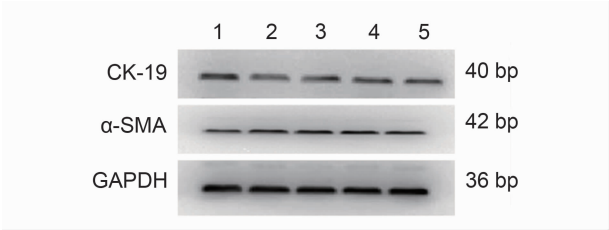


图 3 各组细胞 48 h 时 CK-19、 α -SMA 蛋白表达

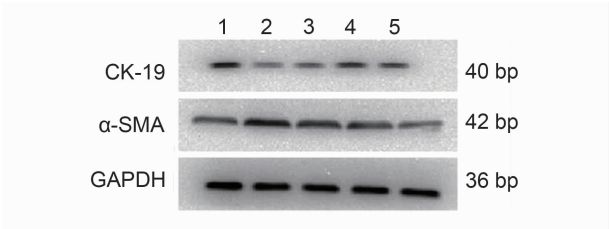
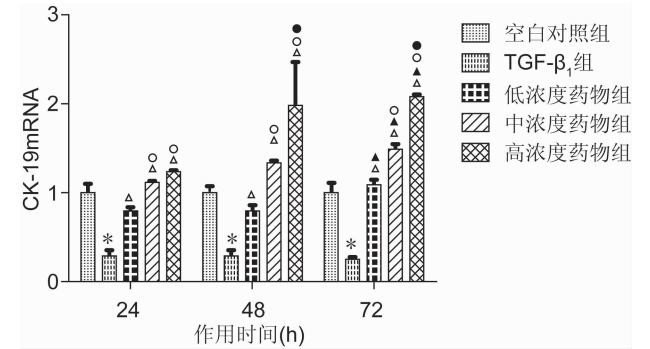


图 4 各组细胞 72 h 时 CK-19、 α -SMA 蛋白表达

3 各组 24、48、72 h CK-19、 α -SMA mRNA 表达比较 (图 5、6) 与空白对照组比较, 3 个时间点 TGF- β_1 组 CK-19 mRNA 表达均下降, TGF- β_1 组 α -SMA mRNA 表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 TGF- β_1 组比较, 药物组每个时间点的 CK-19 mRNA 表达随药物浓度的增加而增多, 3 个浓度药物组 α -SMA mRNA 表达均下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且随着作用时间延长, CK-19 mRNA 表达明显增多, 在 72 h 时间点的高浓度药物组表达达到高峰, 与本组 24 h 比较, 差异亦有统计学意义 ($P < 0.01$)。低、中、高浓度药物组随着浓度增高而 α -SMA mRNA 表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而组内 3 个时间点间 α -SMA mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组在洋金花总碱作用 24、48、72 h 后 CK-19、 α -SMA 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	n	时间	CK-19	α -SMA	
空白对照	5	24 h	1.47 $\pm$ 0.11	0.79 $\pm$ 0.05	
	5	48 h	1.90 $\pm$ 0.49	0.73 $\pm$ 0.06	
	5	72 h	2.80 $\pm$ 0.10	0.88 $\pm$ 0.03	
TGF- β_1	5	24 h	0.68 $\pm$ 0.09 *	1.32 $\pm$ 0.14 *	
	5	48 h	0.65 $\pm$ 0.04 *	1.36 $\pm$ 0.07 *	
	5	72 h	0.53 $\pm$ 0.07 *	1.60 $\pm$ 0.04 *	
低浓度药物	5	24 h	0.67 $\pm$ 0.28	1.04 $\pm$ 0.05 Δ	
	5	48 h	0.85 $\pm$ 0.15	1.04 $\pm$ 0.05 Δ	
	5	72 h	0.46 $\pm$ 0.04	1.06 $\pm$ 0.05 Δ	
中浓度药物	5	24 h	0.79 $\pm$ 0.12	1.06 $\pm$ 0.04 Δ	
	5	48 h	1.02 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta\Delta$	1.06 $\pm$ 0.06 Δ	
	5	72 h	1.23 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta\Delta$	0.93 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$	
高浓度药物	5	24 h	1.04 $\pm$ 0.07 $\Delta\Delta\Delta$	0.83 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	
	5	48 h	1.00 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta\Delta$	0.86 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	
	5	72 h	1.20 $\pm$ 0.11 $\Delta\Delta\Delta$	0.53 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	

注:与空白对照组同期比较, * $P < 0.01$; 与 TGF- β_1 组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与低浓度药物组同期比较, $\Delta P < 0.01$; 与中浓度药物组同期比较, $\Delta\Delta P < 0.05$



注:与空白组比较, * $P < 0.01$; 与 TGF- β_1 组同期比较, $\Delta P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, $\Delta P < 0.01$; 与低浓度药物组同期比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与中浓度药物组同期比较, $\Delta P < 0.01$; 图 6 同

图 5 各组 24、48、72 h CK-19 mRNA 表达比较

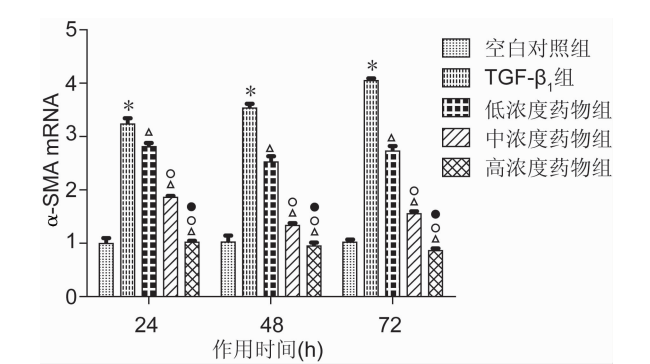


图 6 各组 24、48、72 h α -SMA mRNA 表达比较

讨 论

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 的发病机制目前仍未完全阐明, 但成纤维细胞

(Fb)的活化和异常的损伤修复反应的循环重复是其发生的关键环节。EMT 是成纤维细胞和肌纤维母细胞的主要来源。TGF- β_1 诱导的 EMT 早期变化是 E-钙黏蛋白表达受到抑制,细胞间紧密连接被破坏,上皮细胞丧失黏附特性,逐渐从基底膜上脱落;然后胞质内细胞骨架进行重排,表达新的表型蛋白如 α -SMA,胞质内肌丝也从上皮型的角蛋白(cytokeratin)转变为间质细胞的波形蛋白(vimentin)^[6,7]。A549 细胞源于Ⅱ型肺泡上皮细胞系细胞,在肺纤维化进展过程中修复损伤的效率与正常Ⅱ型肺泡细胞较为接近^[8],诱导它增殖和 EMT 可以模拟Ⅱ型肺泡上皮细胞在病理状态下参与体内肺纤维化形成过程。故选择 A549 细胞作为本实验的细胞模型,研究洋金花总碱对肺纤维化过程中上皮细胞间质转化过程中的影响。

本实验中药物作用 24 h 时的形态观察发现:TGF- β_1 组细胞形态由鹅卵石状变成梭形,类似成纤维细胞,而药物组细胞形态与 TGF- β_1 组细胞形态类似,说明洋金花总碱不能完全逆转上皮细胞间质化的形态改变。但进一步的研究显示,洋金花总碱能在蛋白和基因水平改变 EMT 过程中特征性标记物的表达,增加 CK-19 的表达,抑制 α -SMA 的表达,且呈浓度依赖性和时间依赖性,在药物作用 72 h 及 200 μ g/mL 浓度时最为明显。姜益等^[9]也用类似实验方法进行干预,使用不同浓度的槲皮素干预 TGF- β_1 诱导的 A549 细胞 EMT 过程,用 RT-PCR 和 Western blot 检测上皮间质转化标志性因子 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 的表达变化,结果显示,一定浓度的槲皮素能抑制 A549 细胞的增殖,并在 mRNA 和蛋白水平增加 E-cadherin 表达,降低 N-cadherin、Vimentin 表达,从而抑制 A549 细胞向间质转化。提示通过对细胞特征性标记物的检测可在一定程度上说明洋金花总碱可抑制 A549 细胞发生上皮间质转化,从而减少成纤维细胞的来源,延缓肺纤维化进程。

TGF- β_1 诱导 EMT 发生的机制主要包括依赖 Smad 和非依赖 Smad 两种方式,在器官纤维化过程中其主要以 Smad 方式诱导 EMT,与受体结合后,可激活受体性 Smad2 与 Smad3,同时与共同通路 Smad4 形成三聚体并转入胞核内,诱导 EMT 相关基因表达^[10],三聚体也可诱导转录因子如 Snail、Twist 等表达,通过对后者控制性下调可减轻 TGF- β_1 诱导的 EMT 程度^[11]。另有研究发现 Smad7 是 TGF β_1 /Smad 信号通路的重要的负调控蛋白,能多个环节阻断其信号传导。本研究结果提示洋金花总碱能部分抑

制 TGF- β_1 诱导的 EMT 过程,可为肺纤维化治疗提供新的依据^[12]。但截止目前为止,洋金花总碱与 TGF- β_1 /Smad 信号通路相关性的研究未见相关报道,故洋金花总碱抑制 TGF- β_1 诱导的 EMT 过程的具体靶点需进一步实验探索研究。

参 考 文 献

- [1] Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus [J]. *Chest*, 2007, 132(4): 1311–1321.
- [2] 黄振杰, 郑金旭, 汤艳, 等. 肺泡上皮细胞间质转化及其信号转导途径在肺纤维化中的作用[J]. *临床肺科杂志*, 2011, 16(6): 823–826.
- [3] Zheng L, Zhou Z, Lin L, et al. Carbon monoxide modulates alpha-smooth muscle actin and small proline rich-1a expression in fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 41(1): 85–92.
- [4] 苗明三, 李振国主编. 现代实用中药质量控制技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 782.
- [5] Pieper MP, Chaudhary NI, Park JE. Acetylcholine-induced proliferation of fibroblasts and myofibroblasts *in vitro* is inhibited by tiotropium bromide [J]. *Life Sci*, 2007, 80(24–25): 2270–2273.
- [6] Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(1): 79–89.
- [7] Frame MC, Inman GJ. NCAM is at the heart of reciprocal regulation of E-cadherin- and integrin-mediated adhesions via signaling modulation [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(4): 494–496.
- [8] 王金胜, 曾庆富, 冯德云, 等. 核转录因子 Sp1 在二氧化硅活化的Ⅱ型肺泡细胞中的表达及作用[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2006, 22(6): 710.
- [9] 姜益, 庞军, 吴晓东, 等. 槲皮素对 TGF- β 诱导的人肺腺癌 A549 细胞上皮间质转化的影响[J]. *中国现代医生*, 2013, 51(5): 6–8.
- [10] Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1776.
- [11] Jayachandran A, Konigshoff M, Yu H, et al. SNAI transcription factors mediate epithelial-mesenchymal transition in lung fibrosis [J]. *Thorax*, 2009, 64(12): 1053–1061.
- [12] Fukasawa H, Yamamoto T, Togawa A. Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(23): 8687–8692.

(收稿:2014-06-14 修回:2015-08-05)