

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.02.02

❖ 论著 ❖

大鼠 TGF- β 1 基因 shRNA 干扰慢病毒载体的构建与鉴定

赵彦坡¹, 贾春松²

(1. 北京市门头沟区医院神经内科, 北京 102300; 2. 首都医科大学宣武医院泌尿外科, 北京 100053)

【摘要】目的: 构建大鼠转化生长因子- β 1(TGF- β 1) 基因短发卡 RNA 干扰慢病毒载体, 并通过感染大鼠原代逼尿肌细胞进行鉴定。**方法:** 根据大鼠 TGF- β 1 基因设计合成 3 对 shRNA 序列, 将其分别连接至带荧光标签和抗性基因的慢病毒载体 pHBLV 上, 通过转化至 DH5 α 感受态细胞, 提取阳性克隆后用 DNA 测序进行鉴定, 选择序列正确的克隆大量扩增并提取重组的慢病毒质粒。将重组慢病毒质粒和慢病毒包装的辅助质粒转染至 293T 细胞进行慢病毒包装, 抗性筛选后通过荧光法对病毒进行滴度测定。用慢病毒感染大鼠原代逼尿肌细胞, 通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 TGF- β 1 mRNA 和蛋白的表达水平。**结果:** 设计的 3 种大鼠 TGF- β 1 shRNA 干扰慢病毒载体经测序鉴定构建成功。使用该病毒感染大鼠原代逼尿肌细胞, qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, 与空白对照组和阴性对照组相比, 3 种 TGF- β 1 shRNA 感染组的细胞 TGF- β 1 在 mRNA 和蛋白水平均有不同程度的下调, 其中 TGF- β 1 shRNA 2 的蛋白敲低效率最好 (57%)。**结论:** 本研究成功构建了大鼠 TGF- β 1 shRNA 干扰慢病毒载体, 并在大鼠原代逼尿肌细胞中进行了鉴定, 为进一步的基因治疗研究提供了可能性的基础。

【关键词】 转化生长因子- β 1; RNA 干扰; 慢病毒载体; 原代逼尿肌细胞

【中图分类号】 R363 **【文献标志码】** A

Construction and identification of recombinant lentiviral vectors for rat TGF- β 1 shRNA interference

ZHAO Yan-po¹, JIA Chun-song²

(1. Department of Neurology, Mentougou District Hospital, Beijing 102300; 2. Department of Urology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

【Abstract】Objective: To construct the recombinant lentiviral vector for rat TGF- β 1 shRNA interference and to detect the expression of TGF- β 1 at mRNA and protein level when the packaged lentivirus infected the rat primary detrusor cells. **Methods:** 3 pairs of rat TGF- β 1 shRNA were designed and synthesized, then ligated to the lentivirus vector (pHBLV) with fluorescent tags and resistance gene. These recombinant lentivirus plasmids were transformed into the competent cells *E. coli* DH5 α . The positive clones were verified by DNA sequencing. Then the right clones were largely amplified and extracted. The recombinant lentivirus plasmids and the lentivirus packaging plasmids were co-transfected into 293T cells for lentivirus production. Following the resistance screening, the lentivirus titer was determined by the fluorescence method. Then infected the primary detrusor cells were infected with the above lentivirus to measure the expression of TGF- β 1 at mRNA and protein level by qRT-PCR and Western blot. **Results:** Three kinds of recombinant lentivirus plasmids for TGF- β 1 shRNA were constructed successfully determined by DNA sequencing. The expression of TGF- β 1 at mRNA and protein level was decreased among the three kinds of recombinant lentivirus plasmids infected groups compared to the blank control and the negative control, of which TGF- β 1 shRNA 2 had the best protein silencing efficiency (57%). **Conclusion:** The recombinant lentiviral vectors for rat TGF- β 1 shRNA interference were constructed and the silencing efficiency was identified in rat primary detrusor cells, providing a possible basis for further gene therapy research.

【Key words】 TGF- β 1; shRNA; Lentiviral vector; Primary detrusor cells

转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是 TGF- β 多个亚家族里最主要的亚型之一。近年来, 研究^[1-3] 发现, TGF- β 1 对细胞有重要的调节作用, 包括对细胞生长、细胞增殖、细胞分

化和凋亡的控制, 以及在退行性病变、早期中枢神经系统的发育和控制炎症、免疫反应中发挥着重要作用。对 TGF- β 1 表达选择性抑制, 可以作为某些疾病治疗及研究的靶点, 在一定范围内可能达到控制

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目 (7162078)

作者简介: 赵彦坡 (1976 -), 男, 硕士, 副主任医师。E-mail: zhaoyanpo524@163.com

通讯作者: 贾春松, 博士。E-mail: jm10301050@126.com

疾病的目的。基因干扰(RNA interference, RNAi)技术可以快速的以序列特异方式剔除目的基因表达,而慢病毒载体技术则可以提供长期的基因表达抑制。本实验构建了 TGF-β1 基因 shRNA 干扰的慢病毒载体,并验证了 TGF-β1 的抑制效率,为下一步研究建立了基础,现将研究结果报告如下。

1 材料及方法

1.1 材料

使用购自上海歌凡生物科技有限公司的 293T 细胞。PCR 引物设计和序列以及慢病毒载体购自中国上海吉凯基因。实验用胎牛血清、培养基 DMEM 购自美国 Thermo Scientific 公司,胰蛋白酶购自上海第一生化药业有限公司。大肠杆菌菌株 DH5α 和转染试剂 Lipofectamine TM 购自美国 Invitrogen 公司。限制性内切酶、RNA 抽提试剂 Trizol、M-MLV 逆转录酶、Rnase Inhibitor 和 dNTPs 购于美国的 Thermo Scientific 公司,而 oligo dT 购自上海(中国)生工。蛋白印迹所需的抗体 Anti-TGF-β1 和 Anti-GAPDH 购自 Abcam, PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。细胞裂解液、PMSF 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天。

1.2 方法

1.2.1 TGF-β1 干扰慢病毒载体构建 根据 shRNA 设计的一般原则设计。根据数据库中大鼠 TGF-β1 基因的 mRNA 序列设计 3 条 RNAi 靶点序列和 1 条阴性对照序列(表 1)。该序列由上海吉凯基因技术有限公司设计并合成。单链寡核苷酸片段退火(90 °C 水浴 15 min 后自然冷却至室温)形成双链 DNA(表 2)。同时制备线性化载体:用限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 对载体 pHBLV 进行酶切,使其线性化。退火产物与线性化载体连接(16 °C 连接过夜)。将连接产物转化至感受态细胞 DH5α,挑取若干个克隆,接种菌液中大量扩增,后取菌液进行 DNA 测序检测。将测序结果与数据库中的 TGF-β1 基因序列进行比对,确定构建成功的克隆。

表 1 TGF-β1 基因 RNAi 靶点序列

序号	序列
Mock	TTCTCCGAACGTGTCACGTAA
TGF-β1-RNAi-1	ACAATTCCTGGCGTTACCTTGGTAA
TGF-β1-RNAi-2	GCAAAGATAATGTACTCCACGTGGA
TGF-β1-RNAi-3	CAAGGTGGAGCAGTTGTCCAACATG

表 2 TGF-β1 基因特异性 shRNA 序列

序号	序列
Mock shRNA T	GATCCGTTCTCCGAACGTGTCACGTAATTC AAGAGATTACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTC
Mock shRNA B	AATTC AAAAAATTCCTCCGAACGTGTCACGTAATCTCTTGAATTACGTGACACGTTCCGAGAACC
TGF-β1-shRNA1 T	GATCCGACAATTCCTGGCGTTACCTTGGAATTC AAGAGATTACCAAGGTAACGCCAGGAATGTTTTTTTC
TGF-β1-shRNA1 B	AATTG AAAAAACAATTCCTGGCGTTACCTTGGAATCTCTTGAATTACCAAGGTAACGCCAGGAATGTCCG
TGF-β1-shRNA2 T	GATCCGCAAAGATAATGTACTCCACGTGGATTCAAGAGATCCACGTGGAGTACATTATCTTTGCTTTTTTC
TGF-β1-shRNA2 B	AATTG AAAAAAGCAAAGATAATGTACTCCACGTGGATCTCTTGAATCCACGTGGAGTACATTATCTTTGCG
TGF-β1-shRNA3 T	GATCCGCAAGGTGGAGCAGTTGTCCAACATGTTCAAGAGACATGTTGGACAACCTGCTCCACCTGTTTTTTTC
TGF-β1-shRNA3 B	AATTG AAAAAACAAGGTGGAGCAGTTGTCCAACATGTTCTCTTGAACATGTTGGACAACCTGCTCCACCTTGCG

1.2.2 病毒包装及滴度测定 大量抽提构建好的慢病毒载体和辅助质粒(浓度大于 1 μg/μL, A260/280 在 1.7 ~ 1.8)。293T 细胞接种于 10 cm 的细胞培养皿中,在细胞培养箱内培养(37 °C, 5% CO₂),待细胞长到皿中 70% ~ 80% 可进行转染。将抽提的质粒和辅助质粒(pSPAX2 10 μg, pMD2G 5 μg)以及对应的转染试剂加入到细胞培养液中,培养 6 h 后,换新的培养基继续培养 2 ~ 3 d。收集上清液于离心管中进行离心,4 °C,转速 4 000 rpm,10 min,将上清液用无菌滤器(0.45 μm)进行过滤,收集到超速离心管中再次离心,4 °C,转速 25 000 rpm,2 h。弃上清用病毒保存液重悬病毒颗粒,分装病毒并标记于 -80 °C 冰箱保存。10 倍梯度稀释纯化的病毒

液,每个浓度设定 3 个复孔,同时设定空白对照,感染 293T 细胞(接种于 96 孔培养板),荧光显微镜下观察 48 h 后的荧光表达情况,计数荧光细胞,计算病毒滴度,荧光细胞数除以病毒原液量即为病毒滴度。

1.2.3 原代逼尿肌细胞的分离、培养及鉴定 用颈断法快速处死 Wistar 大鼠,无菌条件下,将大鼠新鲜的膀胱取出,浸入不含 Ca²⁺ 的 HEPES 溶液中,然后用眼科剪镊小心地剔除膀胱逼尿肌的粘膜层和浆膜层,将膀胱切成 0.5 mm × 0.5 mm × 0.5 mm 小块,充分的漂洗后,将组织小块放入胶原酶 IV 消化溶液中 4 °C 孵育过夜,次日晨,将组织块置于 37 °C 水浴锅中,温浴 25 min,弃去上清液,备用。将已完

全消化好的肌条液移至 10 mL 的离心管中,250 g 离心 1 min,弃上清液,重复操作 3 次,并用吸管吹打组织碎片,转入 DMEM 培养基中进行培养。4 d 后首次更换培养液,至此每 3 d 更换 1 次培养液,7 d 后观察细胞融合并进行消化传代。形态学鉴定:(1)利用相差显微镜观察细胞的生长状态和生长规律;(2)将获取逼尿肌细胞制成单细胞悬液,浓度为 1×10^6 细胞/mL,吸取 9 滴细胞悬液置于试管中,加入 1 滴 0.4% 台盼蓝溶液充分的混匀,用血球计数板计算活细胞和死细胞数量。

1.2.4 靶病毒转染逼尿肌细胞 接种 3×10^5 个逼尿肌细胞于 6 孔板内(1 mL/孔)。加入 polybrene (终浓度 $5 \mu\text{g/mL}$),孵育 1 h,每孔再加入相应病毒 $10 \mu\text{L}$ (3×10^6 TU)感染细胞,轻晃混匀后继续培养 6 h 更换新鲜培养基。感染 2~3 d 后,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况,判断慢病毒转染效率。

1.2.5 Western blot 实验 使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。使用浓度为 10% 的 SDS-PAGE 分离胶进行电泳,80 V 恒压电泳至溴酚蓝跑完至浓缩胶层,120 V 分离胶电泳。电泳结束后,将蛋白转移至 PVDF 膜(转膜条件:200 mA 恒流 120 min)。转膜结束后,置于含 5% 脱脂奶粉的封闭液中封闭 1 h,然后进行一抗孵育(4 °C 过夜, Anti-GAPDH 1:2 000, Anti-TGF- β 1 1:1 000)。次日二抗孵育(1:10 000),室温孵育 2 h。洗膜后进行显色反应,使用 ECL 化学发光试剂盒,将膜移入凝胶成像分析仪中,化学光敏模式曝光显影。

1.2.6 qRT-PCR 实验 总 RNA 抽提按照 Trizol 操作说明书进行,并按说明将其逆转录合成 cDNA (42 °C 水浴 30 min,85 °C 水浴 10 min),测定浓度。以逆转录好的 cDNA 为模板按照比例配置 qRT-PCR 反应体系,放入 PCR 仪器进行反应(反应条件:95 °C,2 min 变性;95 °C,10 s;60 °C,40 s,40 次循环;72 °C,30 s (PCR 引物序列如表 3)。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析各组目的基因的表达差异。

表 3 PCR 引物序列

基因	引物	序列
TGF- β 1	Forward	GAAGCGGAAGCGCATCGAGG
	Reverse	TCCACGGCTCAACCACTGCC
GAPDH	Forward	AACAGCGACACCCACTCCTC
	Reverse	GGAGGGGAGATTCACTGTGGT

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 进行实验数据分析,所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,不同组间两两比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)中的 LSD 法(最小显著性法),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 阳性克隆的测序结果

DNA 测序比对结果说明,慢病毒载体 pHBLV 插入的 TGF- β 1 shRNA 片段与设计的完全一致的,表明成功构建 TGF- β 1 shRNA1, TGF- β 1 shRNA2, TGF- β 1 shRNA3 这 3 组重组慢病毒载体。见图 1。

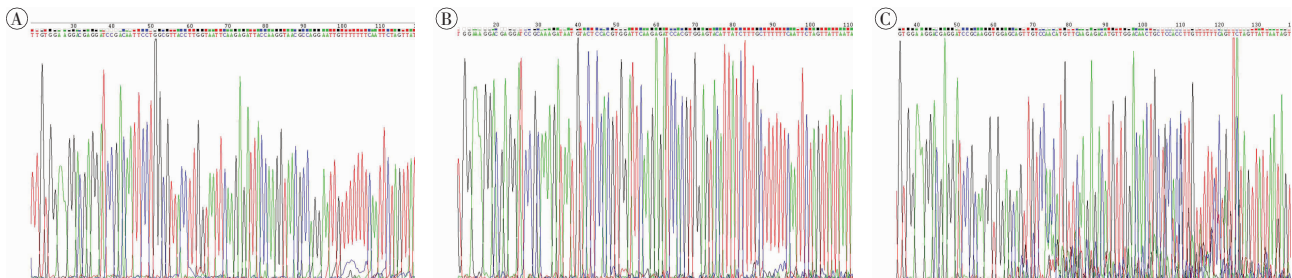


图 1 TGF- β 1 shRNA 测序

A. TGF- β 1 shRNA1 组测序;B. TGF- β 1 shRNA2 组测序;C. TGF- β 1 shRNA3 组测序。

2.2 TGF- β 1 干扰慢病毒感染 293T 细胞

慢病毒感染 293T 细胞 72 h 后,进行细胞荧光检测。观察到大量细胞都表达荧光(约 90% 以上)且细胞形态没有明显改变。该结果提示,3 组 TGF- β 1 shRNA 慢病毒可高效感染 293T 细胞。见图 2。

2.3 TGF- β 1 干扰慢病毒感染逼尿肌细胞

慢病毒感染逼尿肌细胞 72 h 后,观察绿色荧光蛋白表达情况。观察到被感染的逼尿肌细胞也大量

表达绿色荧光且细胞形态良好,该结果提示,3 组 TGF- β 1 shRNA 慢病毒成功感染原代大鼠逼尿肌细胞。但是与慢病毒感染 293T 细胞的结果(图 2)相比,荧光强度有所降低,这可能与原代逼尿肌细胞的特性有关。见图 3。

2.4 Western blot 检测各组细胞中 TGF- β 1 蛋白的表达水平

Western blot 实验结果显示,与空白对照和阴性

对照感染组相比,3 组 TGF-β1 shRNA 感染组的原代逼尿肌细胞中 TGF-β1 的蛋白表达水平均有不同程度的降低 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$),其中 TGF-β1 shRNA2 感染组的 TGF-β1 的蛋白表达水平最低,这提示 TGF-β1 shRNA2 感染原代大鼠逼尿肌细胞具有最佳的抑制效率(57%)。见图 4。

2.5 qRT-PCR 检测各组细胞中 TGF-β1 的 mRNA 表达水平

qRT-PCR 实验结果显示,与空白对照和阴性对照感染组相比,3 组 TGF-β1 shRNA 感染组的原代逼尿肌细胞中 TGF-β1 在 mRNA 水平的表达量均有不同程度的降低 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$),其中 TGF-β1 shRNA2 感染组的 TGF-β1 的在 mRNA 水平的表达最低,这结果提示 TGF-β1 shRNA2 感染原代大鼠逼尿肌细胞具有最佳的抑制效率(87%)。结合 Western blot 的实验结果综合判断,TGF-β1 shRNA2 感染大鼠原代逼尿肌细胞具有比较理想的 TGF-β1 基因沉默效率。见图 5。

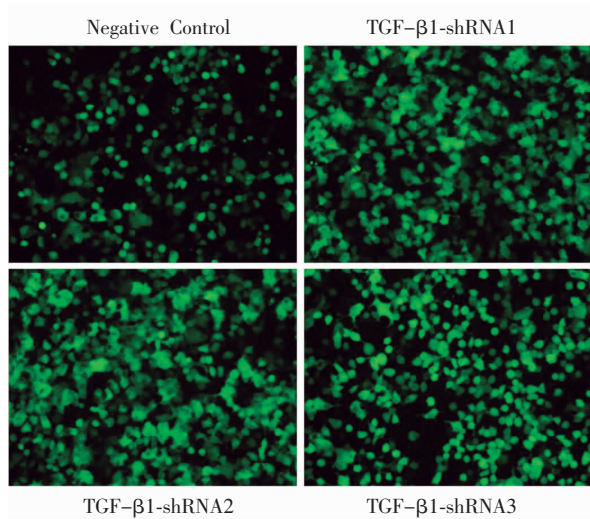


图 2 TGF-β1 shRNA 慢病毒感染 293T 细胞(×200)

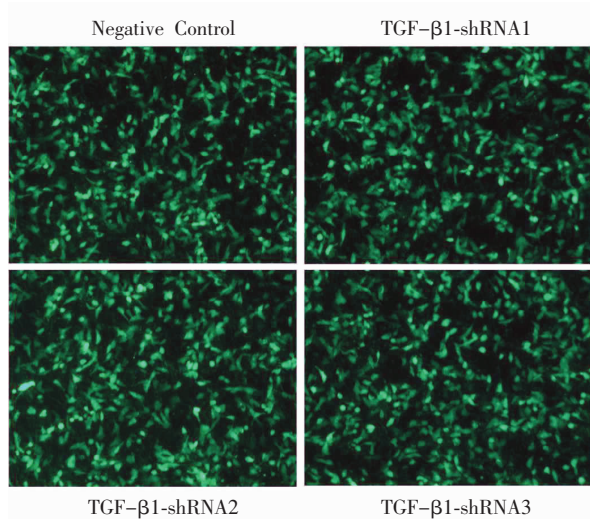


图 3 TGF-β1 shRNA 慢病毒感染逼尿肌细胞(×200)

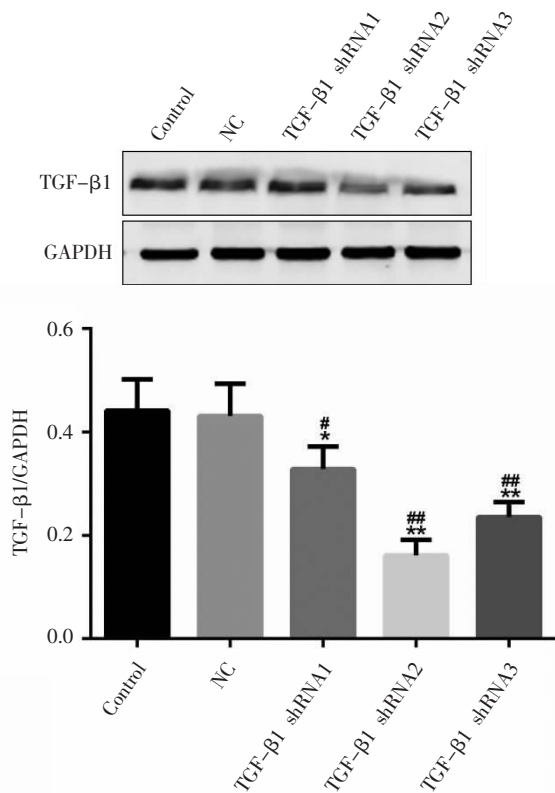


图 4 Western blot 检测各组细胞中 TGF-β1 蛋白的表达水平

Control 为空白对照组,NC 为阴性对照感染组,TGF-β1 shRNA1、TGF-β1 shRNA2、TGF-β1 shRNA3 为慢病毒感染组。
* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与 Control 组比较;# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,与 NC 组比较。

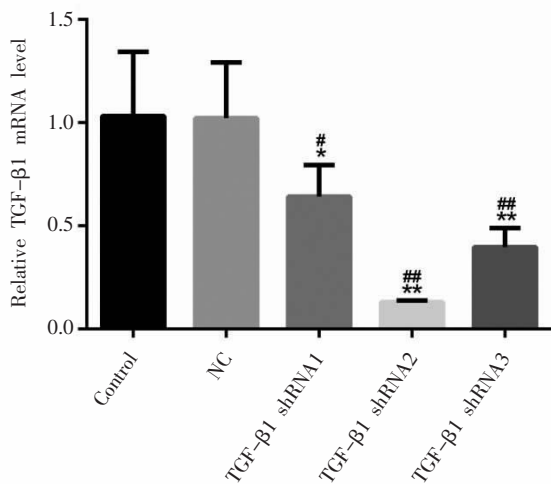


图 5 qRT-PCR 检测各组细胞中 TGF-β1 的 mRNA 表达水平

Control 为空白对照组,NC 为阴性对照感染组,TGF-β1 shRNA1、TGF-β1 shRNA2、TGF-β1 shRNA3 为慢病毒感染组。
* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与 Control 组比较;# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,与 NC 组比较。

3 讨论

TGF-β1 是一组蛋白超家族,其分子亚单位通过

二硫键连接而成的双体,通常由细胞自分泌和旁分泌产生^[4],大多数 TGF- β 1 以潜在的不活跃形式存在,需要激活才能发挥作用^[5]。在人的心肌成纤维细胞、血管的内皮细胞等细胞均有表达。TGF- β 1 在炎症组织修复和胚胎发育等方面有重要的调节作用,且在早期中枢神经系统炎症和免疫反应发挥作用,对神经元变性有保护作用^[6]。TGF- β 1 是一种参与细胞活动的生长因子,在细胞外基质^[7]、肿瘤、炎症等^[8]的形成中均起着重要作用,如肝纤维化等与纤维化相关的各种疾病中起着重要作用^[9],对 TGF- β 1 生物学相关功能控制,为治疗纤维化及癌症^[10]等一些疾病可能成为的主要措施之一。

RNAi 技术近些年发展迅速,它是由 dsRNA 介导作用的在特定酶参与下的特异性基因沉默,在转录和翻译水平上阻断相关基因的一些表达。作为一门生物技术,能够特异性降解 mRNA,能产生相应功能表型缺失,属于转录后水平的基因沉默。相关报道表明, RNAi 被广泛用于研究基因表达的调控和对癌症等多种疾病的治疗干预,沉默 TGF- β 1 不仅是提高抗肿瘤活性的一种有前途的治疗方法^[11],也适用于肾纤维化^[12]和肝纤维化^[13]等治疗研究。

RNAi 的沉默效率主要取决于所设计的靶序列和导入效率。我们在设计 siRNA 序列的时候遵循了以下几个主要原则:(1)长度控制在 21 ~ 25 nt;(2)GC 含量在 30% ~ 50%;(3)避免回文结构;(4)设计好的序列通过比对排除与其他基因的同源性。RNAi 的导入方式主要有两种,一是合成 siRNA,使用专门的转染试剂进行细胞转染。该方法虽然效率较高,但是 siRNA 易降解,且不能持久干扰基因表达,不利于开展细胞分子机制的研究工作。另一种是将 siRNA 设计成对应的 shRNA,通过与病毒载体整合后导入细胞。病毒载体可以通过病毒感染途径将 shRNA 有效导入受体细胞染色体上,达到持久干扰目的序列的效果。诸如神经元细胞、干细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞均可有效感染,从而对多种细胞组织可能产生基因治疗效果。应用慢病毒载体,可提高相关目的基因 shRNA 转导效率,在细胞或组织中实现持久稳定干扰目标基因表达^[14]。

由于 RNAi 序列的干扰效果具有不确定性。课题组设计了 3 条靶向 TGF- β 1 基因的 RNAi 序列(实验中设计了 6 条,选择了沉默效率较高的 3 条总结在本研究中)及阴性对照,并合成对应的 shRNA。将构建成功的 TGF- β 1 shRNA 重组慢病毒载体与病毒包被的辅助质粒按照比例转染 293T 细胞进行包装,通过统计表达荧光的细胞,初步推断包装的慢病毒具有较高的活性(感染率高达 90%)。然后使用

包装好的 3×10^6 TU/孔剂量的慢病毒感染大鼠原代逼尿肌细胞,发现被感染的原代逼尿肌细胞也大量表达了荧光蛋白,细胞形态良好,但荧光亮度和被感染的 293T 相比较弱,且抑制效率最高的 TGF- β 1 shRNA2,其仅能将大鼠逼尿肌细胞 TGF- β 1 蛋白表达减少 57%。该抑制效率与感染普通细胞相比,抑制效率不是很高。本研究尝试过更高浓度的病毒感染原代逼尿肌细胞,虽然达到了理想的 TGF- β 1 抑制效率(约 89%),但是细胞大量死亡且形态发生了明显改变,严重影响了后续细胞功能实验的开展。基于原代逼尿肌细胞与普通细胞系相比,细胞较敏感,传代次数有限,在保证细胞活性高和细胞形态好的前提下,本研究达到了比较理想的沉默效率。在 3 组 TGF- β 1 shRNA 病毒感染组中 TGF- β 1 的表达水平都有不同程度的降低,其中 TGF- β 1 shRNA2 感染组的逼尿肌细胞中 TGF- β 1 的表达量最低。该结果表明,TGF- β 1 shRNA2 在原代逼尿肌细胞中抑制 TGF- β 1 基因表达的效率最高。

TGF- β 1 是一种功能强大的细胞因子,当激活时,它发挥生理和病理功能,包括免疫排斥功能^[15]及免疫耐受^[16],炎症、伤口愈合和器官纤维化,是器官纤维化的最强驱动力^[17],能导致器官病理性纤维化^[18]。研究证明,沉默 TGF- β 1 的表达能够抑制肌纤维母细胞分化潜能^[19],慢病毒载体作用稳定且时间长^[20],能有效、选择性地抑制 TGF- β 1 配体的表达,并对这些细胞表现出抗增殖作用^[21]。在本研究中,TGF- β 1 干扰慢病毒载体成功感染到逼尿肌细胞,达到持久性抑制目的基因表达的效果,作为高效、特异的调节基因表达的技术,适合于动物研究的需要,为神经膀胱性疾疾病基因治疗提供可能。

综上所述,慢病毒载体作为表达外源基因或外源 shRNA 的载体之一,其在相关研究的应用较广泛。本研究成功构建了针对 TGF- β 1 基因的 shRNA 表达的慢病毒载体,验证了其对细胞内 TGF- β 1 抑制的效率,为进一步的基因治疗研究提供了可能性的基础。

参考文献

- [1] Aihara K, Ikeda Y, Yagi S, *et al.* Transforming Growth Factor- β 1 as a Common Target Molecule for Development of Cardiovascular Diseases, Renal Insufficiency and Metabolic Syndrome [J]. *Cardiol Res Pract*, 2010, 2011: 175381.
- [2] Wang HC, Jin CH, Kong J, *et al.* The research of transgenic human nucleus pulposus cell transplantation in the treatment of lumbar disc degeneration [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2019, 35(8): 486 - 492.
- [3] Khakzad MR, Salari F, Javanbakht M, *et al.* Transforming growth factor beta 1 869T/C and 915G/C polymorphisms and risk of autism spectrum disorders [J]. *Rep Biochem Mol Biol*, 2015, 3(2):

- 82 - 88.
- [4] Luo D, Guan Q, Wang K, *et al.* TGF- β 1 stimulates movement of renal proximal tubular epithelial cells in a three-dimensional cell culture via an autocrine TGF- β 2 production[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 350(1):132 - 139.
- [5] Kawarada Y, Inoue Y, Kawasaki F, *et al.* TGF- β induces p53/Smads complex formation in the PAI-1 promoter to activate transcription[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:35483.
- [6] Prehn JH, Backhauss C, Kriegelstein J. Transforming growth factor-beta 1 prevents glutamate neurotoxicity in rat neocortical cultures and protects mouse neocortex from ischemic injury in vivo[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1993, 13(3):521 - 525.
- [7] Li K, Ai W. Investigation of expression and effects of TGF- β 1 and MMP-9 in lens epithelial cells of diabetic cataract rats[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(6):4522 - 4526.
- [8] Dong H, Zhang Y, Xu Y, *et al.* Downregulation of long non-coding RNA MEG3 promotes proliferation, migration, and invasion of human hepatocellular carcinoma cells by upregulating TGF- β 1 [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2019, 51(6):645 - 652.
- [9] Chung AC, Lan HY. MicroRNAs in renal fibrosis[J]. *Front Physiol*, 2015, 6:50.
- [10] Moon JR, Oh SJ, Lee CK, *et al.* TGF- β 1 protects colon tumor cells from apoptosis through XAF1 suppression[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(6):2117 - 2126.
- [11] Moore LD, Isayeva T, Siegal GP, *et al.* Silencing of transforming growth factor-beta1 in situ by RNA interference for breast cancer: implications for proliferation and migration in vitro and metastasis in vivo[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(15):4961 - 4970.
- [12] Takabatake Y, Isaka Y, Mizui M, *et al.* Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease[J]. *Gene Ther*, 2005, 12(12):965 - 973.
- [13] Sun X, Huang X, Zhu X, *et al.* HBOA ameliorates CCl4-induced liver fibrosis through inhibiting TGF- β 1/Smads, NF- κ B and ERK signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*. 2019, 115:108901.
- [14] Huang H, Zhang C, Wang B, *et al.* Transduction with Lentiviral Vectors Altered the Expression Profile of Host MicroRNAs[J]. *J Virol*, 2018, 92(18):e00503.
- [15] Chai HH, Chen MB, Chen GZ, *et al.* Inhibitory effect of TGF- β gene modified human amniotic mesenchymal stem cells on rejection after xenotransplantation of peripheral nerves[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(8):3198 - 3205.
- [16] Zhong M, Zhong C, Cui W, *et al.* Induction of tolerogenic dendritic cells by activated TGF- β /Akt/Smad2 signaling in RIG-I-deficient stemness-high human liver cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):439.
- [17] Pardali E, Gonzalo SD, Gomez-Puerto MC, *et al.* TGF- β -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10):2157.
- [18] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*[J]. 2016, 12(6):325 - 338.
- [19] Wang JP, Yu HM, Chiang ER, *et al.* Corticosteroid inhibits differentiation of palmar fibromatosis-derived stem cells (FSCs) through downregulation of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) [J]. *PLoS One*, 2018, 13(6):e0198326.
- [20] Lawson SK, Dobrikova EY, Shveygert M, *et al.* p38 α mitogen-activated protein kinase depletion and repression of signal transduction to translation machinery by miR-124 and -128 in neurons[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(1):127 - 135.
- [21] Horie M, Saito A, Noguchi S, *et al.* Differential knockdown of TGF- β ligands in a three-dimensional co-culture tumor-stromal interaction model of lung cancer[J]. *BMC Cancer*. 2014, 14:580.

(收稿日期:2019-11-12

学术编辑:杨健)