

## 瘢痕疙瘩中 TIEG1 的高表达\*

唐冰<sup>1)</sup> 朱家源<sup>1)\*\*</sup> 朱斌<sup>1)</sup> 刘阳<sup>1)</sup> 李新强<sup>2)</sup> 毕良宽<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>中山大学附属第一医院烧伤外科, 广州 510080; <sup>2)</sup>广东省深圳市第八人民医院烧伤外科, 深圳 518101)

**摘要** 转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1/Smads)信号转导通路的持续激活是瘢痕疙瘩形成的重要机制. 研究发现这条通路重要的负反馈调节信号分子 Smad7 表达明显下调, Smad2/3 的磷酸化水平和蛋白质量并无明显改变. 但是, Smad7 下调的机制尚不清楚. 采用生物信息学方法对 Smad7 的启动子进行分析; 用 RT-PCR 和蛋白质印迹分别检测了正常皮肤、正常瘢痕及瘢痕疙瘩组织中的 Sp1 样转录因子 TIEG1 mRNA 及蛋白质的表达水平; 体外培养正常皮肤、正常瘢痕及瘢痕疙瘩成纤维细胞, 检测 TIEG1 mRNA 及蛋白的表达水平. 研究结果显示, Smad7 启动子上有 Sp1 的位点, TIEG1 mRNA 及蛋白质水平在瘢痕疙瘩组织及瘢痕疙瘩成纤维细胞中表达明显高于正常瘢痕和正常皮肤 ( $P < 0.05$ ). 说明瘢痕疙瘩中 TIEG1 可能是 Smad7 下调的重要原因, 有必要进一步研究 TIEG1 对 Smad7 的调控作用机制.

**关键词** 瘢痕疙瘩, TIEG1, Smad7

**学科分类号** R619\*.6

转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 是已知的与瘢痕疙瘩 (keloid) 形成关系最为密切、最具代表性的细胞因子<sup>[1]</sup>. TGF- $\beta$ 1 通过与成纤维细胞膜上特定的两类受体——I 型受体(T $\beta$ R-I)和 II 型受体(T $\beta$ R-II) 结合<sup>[2]</sup>, 磷酸化胞质内的 Smad2 和 Smad3, 磷酸化的 Smad2/3 (p-Smad2/3)再与 Smad4 形成三聚体, 转运到核内, 从而调控下游特异基因的表达, 其中包括: a. 激活成纤维细胞 I 型、III 型和 VII 型胶原的启动子, 促进胶原的合成; b. 通过下调基质金属蛋白酶 1 (MMP-1)表达以及上调金属蛋白酶 1 (TIMP-1) 的表达来减少胶原的降解; c. 刺激细胞外基质 (ECM) 受体——整合素的合成, 使细胞粘附于 ECM<sup>[3,4]</sup>. 在此过程中, TGF- $\beta$ 1 通过正、负反馈的调节环路自我调控: p-Smad2/3 与 Smad4 形成的三聚体, 转运到核内, 激活核内自身启动子, 诱导内源性 TGF- $\beta$ 1 的表达, 放大信号, 形成正反馈调节环路; Smad7 是 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路最主要的负反馈调节信号分子<sup>[5,6]</sup>, p-Smad2/3 与 Smad7 启动子上的特定 DNA 序列 (smad binding element, SBE) 结合, 激活 Smad7 启动子, 上调 Smad7 表达<sup>[7]</sup>, Smad7 从核内转移到胞浆, 通过竞争性占据 T $\beta$ R-I 而抑制受体蛋白激酶对 R-Smads (Smad2、3) 的磷酸化, 从而拮抗了 TGF- $\beta$ 1 信号的传导, 形

成负反馈调节环路, 以维持该功能系统的调控平衡. 当 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路内部调节机制发生异常, 从而引起此信号传导通路的持续激活, 使得成纤维细胞过度增生和以胶原蛋白(尤其是 I 型胶原)为主的 ECM 过量沉积, 就最终导致瘢痕疙瘩的发生.

然而, 瘢痕疙瘩中自身的正、负反馈调节发生异常的机制至今尚不清楚. 我们提出假设, 在瘢痕疙瘩中是否存在有 Smad7 的表达缺陷, 从而使 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路不能被 Smad (Smad7) 所抑制而持续激活.

我们首先用 RT-PCR 和蛋白质印迹分别检测了正常皮肤、正常瘢痕及瘢痕疙瘩组织中的 Smad2、Smad3, 磷酸化的 Smad2、3 和 Smad7 的 mRNA 及蛋白质的表达水平. 体外培养正常皮肤、正常瘢痕及瘢痕疙瘩成纤维细胞, 检测 Smad2、Smad3, 磷酸化的 Smad2、3 和 Smad7 的 mRNA 及蛋白质的表达水平. 结果发现 Smad7 的 mRNA 及蛋白质水平在瘢痕疙瘩组织及瘢痕疙瘩成纤维细胞中表达

\* 广东省自然科学基金(7001657)和广东省医学科研基金(B2007042)资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 020-87755766-8235, E-mail: zhujiayuan@163.net

收稿日期: 2007-08-06, 接受日期: 2007-09-28

明显低于正常瘢痕和正常皮肤 ( $P < 0.05$ ), 而 Smad2/3 及磷酸化的 Smad2/3 并无明显改变. 这些研究结果提示: 在瘢痕疙瘩形成中, 存在有 Smad7 的表达缺陷, 低表达的 Smad7 可能是增高的 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号传导不能被自身的负反馈循环终止的重要原因. 然而, Smad7 下调的机制尚不清楚.

我们采用生物信息学方法对 Smad7 的启动子进行了序列分析. 在 GenBank 数据库中找到 Smad7 的序列, 在 DBTSS 数据库中确定了 Smad7 的启动子序列, 然后在 Transfac 数据库中进行基因启动子分析. 发现 Smad7 启动子上有 4 个 SP1 的结合位点, 提示 Smad7 可能受 SP1 样转录因子的调控.

TIEG (TGF- $\beta$ -inducible early gene) 蛋白是近年来报道的 Sp1 样转录因子家族新成员, 是 TGF- $\beta$  诱导的早期转录基因产物. TIEG1 在 1995 年从人成骨细胞 (hFOB) 中通过差异展示 PCR 方法得到的<sup>[8]</sup>. 它位于人染色体 8q22.2, 跨越 8 kb, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 编码 480 个氨基酸残基, 分子质量为 72 ku. TIEG1 的蛋白质结构只存在转录抑制区, 是一种专一转录抑制蛋白, 功能为抑制基因的表达<sup>[8,9]</sup>.

为了证实在瘢痕疙瘩中 TIEG1 的表达情况, 我们用 RT-PCR 和蛋白质印迹分别检测了正常皮肤、正常瘢痕及瘢痕疙瘩组织中的 TIEG1 mRNA 及蛋白质的表达水平, 体外培养正常皮肤、正常瘢痕及瘢痕疙瘩成纤维细胞, 检测 TIEG1 mRNA 及蛋白质的表达水平. 实验结果显示: 瘢痕疙瘩中存在 TIEG1 高表达, 结合已知 TIEG1 的功能, TIEG1 极可能是 Smad7 下调的重要原因. 因此有必要进一步深入研究 TIEG1 对 Smad7 的直接调控机制.

## 1 材料和方法

### 1.1 标本来源

标本取自我院进行整形手术的患者. 瘢痕疙瘩 12 例, 男性 7 例, 女性 5 例, 年龄 16~46 岁, 中位年龄 26 岁, 病程 6~24 个月; 正常瘢痕 12 例; 对照正常皮肤 12 例, 取自邻近正常皮肤. 均经患者知情同意. 所有的组织经液氮速冻, -80℃ 存备用.

### 1.2 人成纤维细胞的分离与培养

将新鲜正常皮肤、正常瘢痕和瘢痕疙瘩块, 无菌条件下清洗、消毒后, 剪碎成 0.5 cm × 0.5 cm 大小的组织块, 去除皮下组织, 接种于培养瓶内,

0.5% Dispase II 4℃ 消化过夜, 分离表皮和真皮, 真皮部分用 0.1% I 型胶原酶 37℃ 消化 4 h, 用加入 20% 胎牛血清的 DMEM 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养, 每周换液 2 次, 获得瘢痕疙瘩成纤维细胞, 待细胞 70%~80% 汇合生长时, 用 0.25% 胰酶和 0.04% 的 EDTA 消化传代, 取第 4~5 代细胞进行实验.

### 1.3 RT-PCR

所有的用品均须经 0.1% DEPC 水浸泡并高温消毒处理. 组织标本解冻后, 用 TRIzol reagent (Invitrogen 公司) 溶解匀浆并离心取上清, 体外培养的成纤维细胞吸去培养基, 加入 1 ml TRIzol 裂解细胞, 转移至 EP 管中, 按 TRIzol 法提取总 mRNA. 然后用分光光度计定量 RNA 的浓度和纯度:  $A_{260}/A_{280}$  的比值范围在 1.8~2.0 之间说明 RNA 的纯度较好. 建立 20  $\mu$ l 逆转录体系, 用 SuperScript<sup>TM</sup> III (Invitrogen 公司) 逆转录, 然后进行 PCR 反应, 所用的引物如下(表 1):

Table 1 Synthesis of primers

Gene	Primer sequence
<i>tieg1</i>	F: 5' GGAGGAAAGAATGGAAATGA 3' R: 5' CAGAAGGACTGTAAGGTGGA 3'
<i>smad2</i>	F: 5' TTGATGGTCGCTCCAGGTAT 3' R: 5' GAGGCGGAAGTTCTGTTAGG 3'
<i>smad3</i>	F: 5' AACGGGCAGGAGGAGAAATG 3' R: 5' ACAGGCGGCAGTAGATGACA 3'
<i>smad7</i>	F: 5' TACCCGATGGATTTTCTCAA 3' R: 5' TCTTCTCCTCCCAGTATGCC 3'
<i>actin</i>	F: 5' CACCAACTGGGACGACA 3' R: 5' GTRACTGCGCTCAGGAGG 3'

### 1.4 蛋白质印迹

组织样本用裂解液裂解匀浆, 离心取上清, 超声, 进行蛋白质定量(microBCA, Pierce); 体外培养成纤维细胞吸掉培养基, 加入裂解液后用细胞刮子收集, 超声, 同样进行蛋白质定量. 根据定量结果对各蛋白质样本进行校正, 加入 Lamemlli 缓冲液, 置沸水中煮 5 min, 离心. 取样本上清 30  $\mu$ l, 于 200 V 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 45 min. 电泳后将凝胶完整地取下, 于转移缓冲液中 100 V 转膜 60 min, 室温封闭 1 h 后, 孵一抗 4℃ 过夜. 然后与 HRP- 结合的二抗(1:2 000)室温孵育 1 h. 用 ECL 显影, 定影, 拍照并进行计算机图像分析. Anti-phos-Smad2、Anti-phos-Smad3 以及 Anti-Smad2 和 Anti-Smad3 均来自 Cell Signal 公司,

Anti-Smad7 来自 Abcam 公司, Anti-TIEG1 来自 Santa Cruz 公司; 二抗来自 Jackson 公司; PVDF 膜、ECL 来自 Amersham 公司.

**1.5 统计学分析**

用 SPSS13.0 统计软件进行两独立样本的 *t* 检验.

**2 结 果**

**2.1 生物信息学分析结果**

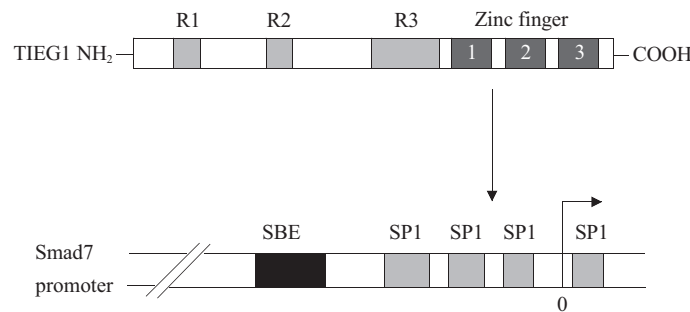
GenBanks 数据库: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; DBTSS 数据库: <http://dbtss.hgc.jp/>; Transfac

数据库: <http://www.gene-regulation.com>

我们发现 Smad7 启动子上, 除了有一个 SBE 外, 转录起始点之前有 3 个 Sp1 结合位点, 转录起始点之后有一个 Sp1 结合位点, 提示有 Sp1 样转录因子结合在 Smad7 的启动子上(图 1).

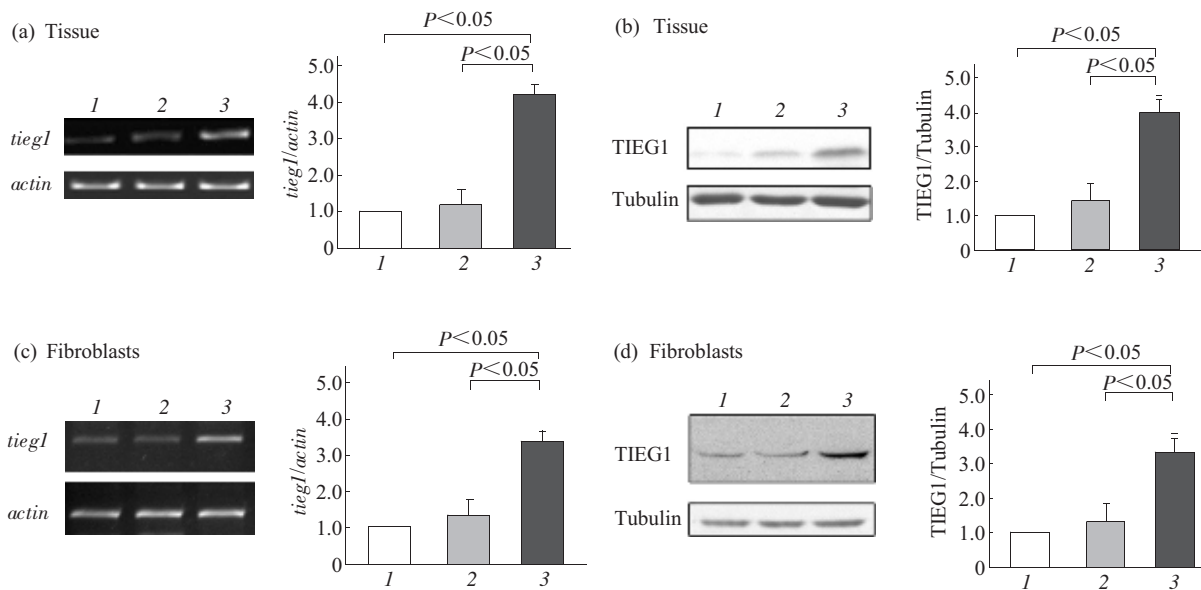
**2.2 瘢痕疙瘩组织及瘢痕疙瘩成纤维细胞中, TIEG1 mRNA 及蛋白质水平高表达**

图 2 表明: TIEG1 mRNA 水平在瘢痕疙瘩中表达明显高于正常瘢痕和正常皮肤组织( $P < 0.05$ ), 在瘢痕疙瘩成纤维细胞中表达明显高于正常瘢痕和正常皮肤成纤维细胞( $P < 0.05$ ); TIEG1 蛋白水平在



**Fig. 1 The sp1 binding sites in the promoter of Smad7**

There are four Sp1 binding sites in the promoter of Smad7. TIEG1, a sp1-like transcription factor, can regulate Smad7 through binding the Sp1 binding sites.



**Fig. 2 The mRNA and protein levels of TIEG1 in normal skin, normal scar and keloid**

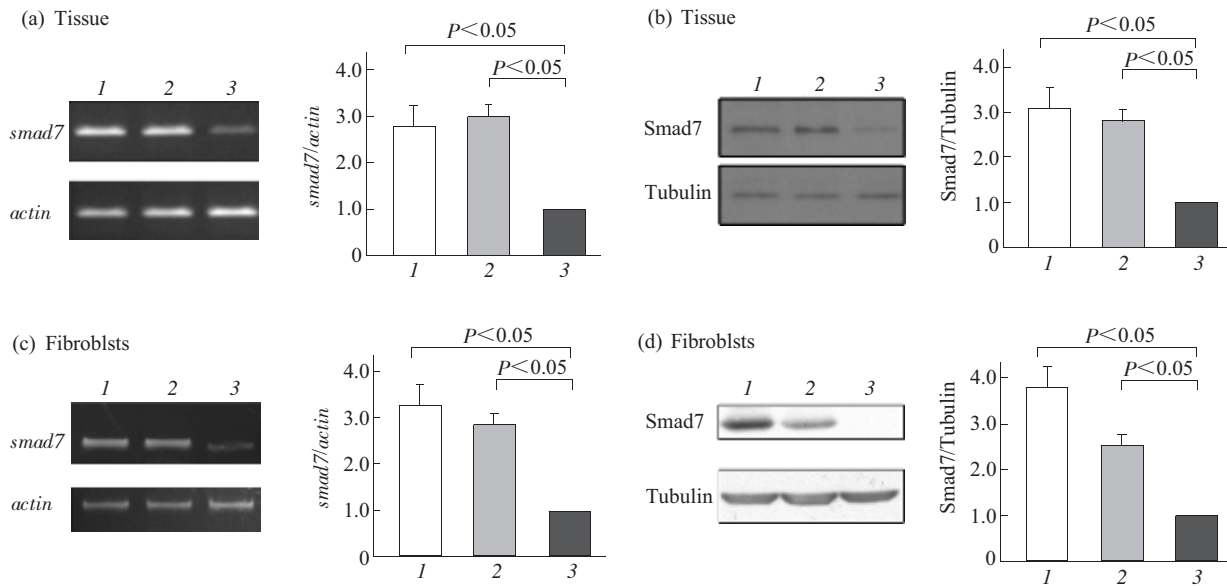
(a) RT-PCR was performed using specific primers for *tieg1* or *actin* in the tissues of normal skin, normal scar and keloid. The level of *tieg1* mRNA in keloid is higher than in normal skin and normal scar ( $P < 0.05$ ). Representative data are shown. (b) The tissue lysates of normal skin, normal scar and keloid were subjected to Western blotting with antibodies against TIEG1 or tubulin. The level of TIEG1 protein in keloid is higher than in normal skin and normal scar ( $P < 0.05$ ). Data are representatives of three separate experiments. (c) RT-PCR was performed using specific primers for *tieg1* or *actin* in the fibroblasts of normal skin, normal scar and keloid. The level of *tieg1* mRNA in keloid is higher than in normal skin, normal scar ( $P < 0.05$ ). The data represent ( $\bar{x} \pm s$ ) of three separate experiments. (d) The fibroblast lysates of normal skin, normal scar and keloid were subjected to Western blotting with antibodies against TIEG1 or tubulin. The level of TIEG1 protein in keloid is higher than in normal skin, normal scar ( $P < 0.05$ ). Representative images are shown. 1: Normal skin; 2: Normal scar; 3: Keloid.

瘢痕疙瘩中明显高于正常瘢痕和正常皮肤组织( $P < 0.05$ ), 在瘢痕疙瘩成纤维细胞中明显高于正常瘢痕和正常皮肤成纤维细胞( $P < 0.05$ ).

### 2.3 瘢痕疙瘩组织及瘢痕疙瘩成纤维细胞中, Smad7 mRNA 及蛋白质水平低表达

Smad7 mRNA 水平在瘢痕疙瘩中表达明显低

于正常瘢痕和正常皮肤组织( $P < 0.05$ ), 在瘢痕疙瘩成纤维细胞中表达明显低于正常瘢痕和正常皮肤成纤维细胞( $P < 0.05$ ); Smad7 蛋白水平在瘢痕疙瘩组织中表达明显低于正常瘢痕和正常皮肤组织( $P < 0.05$ ), 在瘢痕疙瘩成纤维细胞中表达明显低于正常瘢痕和正常皮肤成纤维细胞( $P < 0.05$ , 图 3).



**Fig. 3 The mRNA and protein levels of Smad7 in normal skin, normal scar and keloid**

(a) RT-PCR was performed using specific primers for *smad7* or *actin* in the tissues of normal skin, normal scar and keloid. The level of *smad7* mRNA in keloid is lower than in normal skin, normal scar ( $P < 0.05$ ). Representative data are shown. (b) The tissue lysates of normal skin, normal scar and keloid were subjected to Western blotting with antibodies against Smad7 or tubulin. The level of Smad7 protein in keloid is lower than in normal skin, normal scar ( $P < 0.05$ ). Data are representatives of three separate experiments. (c) RT-PCR was performed using specific primers for *smad7* or *actin* in the fibroblasts of normal skin, normal scar and keloid. The level of *smad7* mRNA in keloid is lower than in normal skin, normal scar ( $P < 0.05$ ). The data represent ( $\bar{x} \pm s$ ) of three separate experiments. (d) The fibroblast lysates of normal skin, normal scar and keloid were subjected to Western blotting with antibodies against Smad7 or tubulin. The level of Smad7 protein in keloid is lower than in normal skin, normal scar ( $P < 0.05$ ). Representative images are shown. 1: Normal skin; 2: Normal scar; 3: Keloid.

### 2.4 瘢痕疙瘩组织及瘢痕疙瘩成纤维细胞中, Smad2, Smad3, 磷酸化的 Smad2 和磷酸化的 Smad3 mRNA 及蛋白质表达水平无明显变化

在正常皮肤、正常瘢痕和瘢痕疙瘩及体外培养的成纤维细胞中, Smad2 mRNA 及蛋白质表达水平无明显变化, 磷酸化的 Smad2 (p-Smad2) 蛋白表达水平无明显变化; 在瘢痕疙瘩及瘢痕疙瘩成纤维细胞中, Smad3 mRNA 及蛋白质表达水平, 以及磷酸化的 Smad3 (p-Smad3) 蛋白表达水平有所增加, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 图 4).

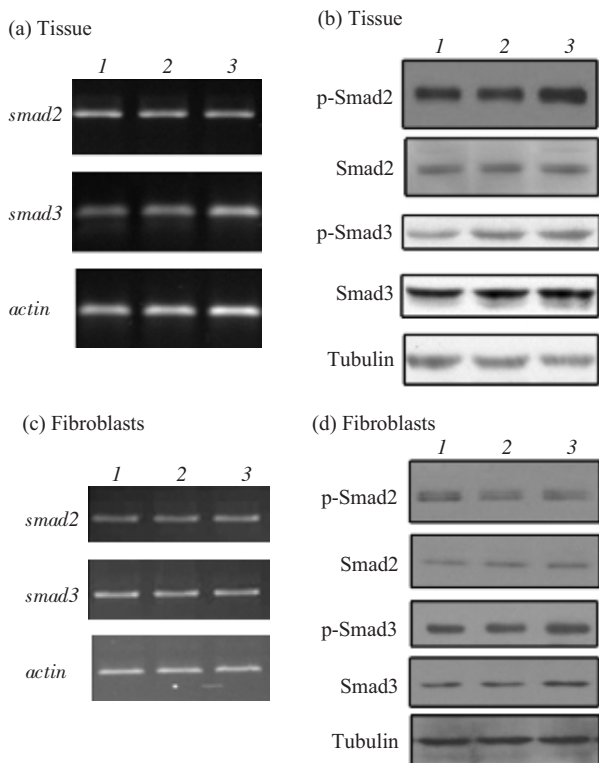
## 3 讨 论

瘢痕疙瘩是临床常见的病理性瘢痕, 是人皮肤

遭受创伤、烧伤或手术后以胶原过度沉积于真皮和皮下组织为特征的皮肤胶原性疾病, 类似于良性肿瘤病变, 是目前临床上尚无有效治疗手段的难治疾病之一<sup>[10]</sup>. TGF- $\beta$ 1 是一种多功能细胞因子, 对炎症反应、细胞的增殖、分化、凋亡及细胞外基质的合成等起重要的调节作用. 它是目前已知与瘢痕过度形成关系最为密切的细胞因子, 具有炎症趋化、改变伤口愈合进度、促进创面收缩, 促进瘢痕形成等作用<sup>[11~13]</sup>.

TGF- $\beta$ 1 通过与其特定的两类受体——I 型受体(T $\beta$ R- I)和 II 型受体(T $\beta$ R- II) 结合从而把细胞外的信号传递到细胞内. 而在细胞内, 则主要通过 Smads 通路发挥作用<sup>[3,4]</sup>. 目前发现哺乳动物 Smads





**Fig. 4 The mRNA and protein levels of Smad2, 3 in normal skin, normal scar and keloid**

(a) RT-PCR was performed as described in Figure 1 using specific primers for *smad2*, *smad3* or *actin* in the tissues of normal skin, normal scar and keloid. Representative images are shown. (b) The levels of p-Smad2, Smad2, p-Smad3 and Smad3 in normal skin, normal scar and keloid tissues were assessed by Western blotting with antibodies against p-Smad2, Smad2, p-Smad3 and Smad3. In order to verify equal loading, the membrane was stripped and reprobed with antibody against tubulin. The blots shown are representative of three independent experiments. (c) The mRNA levels of *smad2* and *smad3* in the fibroblasts of normal skin, normal scar and keloid were detected as described in (a). Representative images are shown. (d) The levels of p-Smad2, Smad2, p-Smad3 and Smad3 in normal skin, normal scar and keloid fibroblasts were assessed by Western blotting as described in (b). Representative images are shown. 1: Normal skin; 2: Normal scar; 3: Keloid.

有 8 种, 根据其结构和功能的不同分为三类: 第一类为 R-Smads, 包括 Smad1、2、3, Smad5、8, 其中 Smad2、3 参与 TGF- $\beta$  和活化素的信号传导, Smad1、5、8 参与骨形态发生蛋白(BMP)的信号传导; 第二类为 Co-Smads, 包括 Smad4, 与 Smad1、2、3, Smad5 结合, 参与上述 3 种信号传导; 第三类为 anti-Smads, 包括 Smad6、7, 主要功能为抑制 R-Smads 和 Co-Smads 介导的信号传导。

我们的研究发现, TGF- $\beta$ 1/Smads 信号转导通路中各类型 Smads 的表达是不相同的. 我们检测了正常皮肤、正常瘢痕及瘢痕疙瘩组织中的 Smad2、

Smad3 和 Smad7 的 mRNA 及蛋白质的表达水平, 结果发现, 负反馈调节信号分子 Smad7 mRNA 及蛋白质明显低表达, Smad2 mRNA 和蛋白质表达水平, 以及磷酸化的 Smad2 (p-Smad2) 蛋白表达水平无明显变化, Smad3 mRNA 及蛋白质表达水平, 以及磷酸化的 Smad3 (p-Smad3) 蛋白表达水平有所增加, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ). 这些结果提示我们, 在瘢痕疙瘩中, 存在有 Smad7 的表达缺陷, 从而使得自身的正、负反馈调节机制发生异常. 但是, 在瘢痕疙瘩形成过程中, Smad7 下调的具体机制目前尚无报道。

通过生物信息学方法, 我们发现在 Smad7 的启动子上除了有和 Smad3 结合的 Smad 结合原件(SBE)序列之外, 在转录起始点的上游和下游共有 4 个 Sp1 相关的 GC 富含序列, 这提示 Smad7 启动子上有 Sp1 样转录因子结合. TIEG1 就是这样一种 Sp1 样转录因子, 它在体内许多组织和细胞中都有表达. TGF- $\beta$ 1 是最重要的诱导因子, 通过结合 TIEG1 启动子中 TGF- $\beta$ 1 结合区, 激活转录, 时间和剂量依赖性诱导 TIEG1 mRNA 的表达<sup>[14~16]</sup>. TIEG1 具有 Sp1 样蛋白家族的典型特征: C 端为特征性锌指 DNA 结合区, 调节基因的表达(图 1). 但是, 与其他 Sp1 样家族成员不同, TIEG1 的蛋白质结构只存在转录抑制区, 是一种专一转录抑制蛋白, 功能为抑制基因的表达。

我们的研究发现, 瘢痕疙瘩组织及瘢痕疙瘩成纤维细胞中, TIEG1 mRNA 及蛋白质水平高表达. 目前已知积雪草苷可以上调瘢痕成纤维细胞 Smad7 表达<sup>[7]</sup>, 将体外培养瘢痕疙瘩成纤维细胞分 2 组, 实验组培养液中加入积雪草苷, 对照组未加积雪草苷, 检测 TIEG1 和 Smad7 mRNA 及蛋白质的表达水平. 结果发现, 实验组 TIEG1 mRNA 及蛋白质水平明显低于对照组, Smad7 的 mRNA 及蛋白质水平明显高于对照组(未发表的研究结果). 实验结果提示: 瘢痕疙瘩中存在 TIEG1 高表达, 高表达的 TIEG1 可能是 Smad7 下调的重要原因. 下一步, 我们将采用小分子干扰的方法干扰 TIEG1 的表达, 然后检测 Smad7 的 mRNA 和蛋白质水平. 另外, 还将突变掉 Smad7 启动子上的 Sp1 位点, 再检测 Smad7 的活性, 从而进一步阐明 TIEG1 对 Smad7 直接调控的机制。

#### 参考文献

- 1 Liu W, Wang D R, Cao Y L. TGF- $\beta$ : a fibrotic factor in wound

- scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2004, **14** (4):123~136
- 2 Bock O, Yu H, Zitron S, *et al.* Studies of transforming growth factors beta 1-3 and their receptors I and II in fibroblast of keloids and hypertrophic scars. *Acta Derm Venereol*, 2005, **85** (3): 216~220
  - 3 Attisano L, Wrana J L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*, 2002, **296** (5573): 1646~1647
  - 4 Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003, **113** (6): 685~700
  - 5 Nakao A, Afrakhte M, Morén A, *et al.* Identification of Smad7, a TGF- $\beta$  inducible antagonist of TGF- $\beta$  signaling. *Nature*, 1997, **389** (6651): 631~635
  - 6 Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, *et al.* The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF- $\beta$  receptor and functions as an antagonist of TGF- $\beta$  signaling. *Cell*, 1997, **89** (7): 1165~1169
  - 7 Denissova N G, Pouponnot C, Long J Y, *et al.* Transforming growth factor  $\beta$ -inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (12): 6397~6402
  - 8 Subramaniam M, Harris S A, Oursler M J, *et al.* Identification of a novel TGF- $\beta$ -regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res*, 1995, (23): 4907~4912
  - 9 Hefferan T E, Reinholz G G, Rickard D J, *et al.* Overexpression of a nuclear protein, TIEG, mimics transforming growth factor- $\beta$  action in human osteoblast cell. *J Biol Chem*, 2000, (275): 20255~20259
  - 10 De Lorenzi F, Tielemans H J, van der Hulst R R, *et al.* Is the treatment of keloid scars still a challenge in 2006? *Ann Plast Surg*, 2007, **58** (2): 186~192
  - 11 Al-Attar A, Mess S, Thomassen JM, *et al.* Keloid pathogenesis and treatment. *Plast Reconstr Surg*, 2006, **117** (1): 286~230
  - 12 Pellard S. Epidemiology, aetiology and management of abnormal scarring: a review of the literature. *J Wound Care*, 2006, **15** (1): 44~48
  - 13 Latha S, James L W, Hebda P A, *et al.* Gene expression patterns in isolated keloid fibroblasts. *Wound Rep Reg*, 2006, **14**: 463~470
  - 14 Hefferan T E, Reinholz G G, Rickard D J, *et al.* Overexpression of a nuclear protein, TIEG, mimics transforming growth factor- $\beta$  action in human osteoblast cell. *J Biol Chem*, 2000, (275): 20255~20259
  - 15 Subramaniam M, Hefferan T E, Tau K, *et al.* Tissue, cell type and breast cancer stage-specific expression of a TGF- $\beta$  inducible early transcription factor gene. *J Biol Chem*, 1998, (68): 226~236
  - 16 Hefferan T E, Subramaniam M, Khosla S, *et al.* Cytokine specific induction of the TGF- $\beta$ -inducible early gene(TIEG): regulation by specific members of the TGF- $\beta$  family. *J Biol Chem*, 2000, (78): 380~390
  - 17 潘 姝, 利天增, 李叶扬, 等. 积雪草苷对增生性瘢痕成纤维细胞增殖与 Smad 信号通路的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2004, **18** (4): 291~294  
PAN S, LI T Z, LI Y Y, *et al.* Chinese J Reparative and Reconstructive Surgery, 2004, **18** (4): 291~294

## Increased Expression of TGF- $\beta$ Inducible Early Gene (TIEG1) in Keloid Scarring\*

TANG Bing<sup>1</sup>, ZHU Jia-Yuan<sup>1\*\*</sup>, ZHU Bin<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, LI Xin-Qiang<sup>2</sup>, BI Liang-Kuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Burns, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou 510080, China;

<sup>2</sup>Department of Burns, The Eighth People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518101, China)

**Abstract** The transforming growth factor (TGF)-beta/Smad signaling pathway is thought to play a major role in keloid formation. This study showed that the expression of inhibitory Smad7 was significantly down regulated in keloid compared with normal scar ( $P < 0.05$ ) and normal skin ( $P < 0.05$ ), however, no significant difference of Smad2, 3 and the phosphorylation of Smad2,3. But the mechanism of reduced expression of Smad7 is unclear. Sp1 binding sites were found in Smad7 promoter by bioinformatics system analysis, then, the expression of TIEG1 mRNA and proteins in keloids, in normal skin and in normal scars tissues and fibroblasts were investigated. Dermal fibroblasts were obtained from biopsies of keloids, normal scars and normal skin. Fibroblasts were cultured *in vitro*. The expression of TIEG1 mRNA was analysed by RT-PCR and protein expression was determined by Western blot analysis. The results demonstrated increased mRNA and protein expressions of TIEG1 in keloid tissue and fibroblasts as compared to normal scar tissues and fibroblasts ( $P < 0.05$ ) and normal skin tissues and

fibroblasts ( $P < 0.05$ ). It suggested that TIEG1 might play a significant role to the decreased expression of the inhibitory Smad7 in keloid. Further investigation is necessary to illuminate the mechanism of TIEG1 regulating Smad7.

**Key words** keloid, TGF- $\beta$  inducible early gene (TIEG1), Smad7

---

\*This work was supported by grants from Natural Science Foundation of Guangdong Province (7001657) and Medical Science Research Foundation of Guangdong Province (B2007042).

\*\*Corresponding author . Tel: 86-87755766-8235, E-mail: zhujiayuan@163.net

Received: August 6, 2007 Accepted: September 28, 2007