

利用四环素调控系统研究 CHIP 对 TGF- β 信号通路的抑制性调节*

徐夏莲 辛 宏 张新军 任芳丽 王银银 常智杰**

(清华大学生物科学与技术系, 清华大学生命科学与医学研究院, 北京 100084)

摘要 为了研究伴侣分子相互作用蛋白 CHIP 对 TGF- β 信号通路的调控, 利用四环素基因表达调控系统, 建立四环素调控表达 CHIP 的稳定细胞系(Mv1Lu-Tet off-CHIP). 利用此细胞模型, 发现 CHIP 的过量表达可显著降低细胞内 Smad2/3 蛋白水平; 荧光素酶报告分析也表明开启 CHIP 蛋白表达可明显降低 Smads 介导的基因转录活性; 进一步的免疫印迹结果显示 CHIP 蛋白可明显下调 TGF- β 所诱导的下游基因 JunB 的表达. 上述结果提示 CHIP 可以作为一种新的蛋白质分子抑制性调节 TGF- β 信号通路.

关键词 四环素调控, CHIP, TGF- β , Smad2/3, JunB, 抑制

学科分类号 R735

转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族是一大类具有多种生物学功能的细胞因子. TGF- β 信号从细胞外, 经过跨膜受体、浆内 Smads 蛋白逐一传递到核内^[1], 调节不同来源细胞的增殖、分化及凋亡, 在胚胎发育, 创伤愈合, 胞外基质形成, 骨重建, 免疫调节等生理过程及多种肿瘤发生、间质纤维化等病理过程中发挥重要作用^[2]. 对 TGF- β /BMP 信号传导通路的研究有助于揭示相关疾病发生发展的分子机制, 因此, 对该信号途径中的重要传递分子的研究、探讨以及寻找它们的调节因子, 一直是人们关注的热点.

CHIP (carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein, CHIP) 是 Ballinger 等^[3]于 1999 年发现的一个 Hsp/Hsc70 相互作用蛋白. 我们前期工作通过酵母双杂交技术筛选人脑 cDNA 文库, 发现 CHIP 是 Smad1 的相互作用蛋白. 我们研究了 CHIP 对 Smad1 所介导的 BMP 信号通路的调节作用^[4]以及在肾纤维化组织中的表达情况^[5], 发现 CHIP 对 TGF- β 信号通路具有负调控作用^[6,7]. 然而, 这些研究均是采用单纯过量表达系统, 为了确切了解 CHIP 在 TGF- β 信号通路中的调节功能, 我们在高度响应 TGF- β 信号的 Mv1Lu 细胞中建立了受四环素调节过量表达 CHIP 的细胞系, 利用此细胞模型从基因转录水平控制细胞内 CHIP 蛋白的表达, 从而在一种遗传背景更为一致的前提下观察 CHIP 对 TGF- β 信号通路的调控作用.

1 材料和方法

1.1 材料

四环素调控系统表达质粒 (pTet-off, pTRE2, pTRE2/Luc) 购于 CLONTECH 公司; 蛋白质电转移系统为 BioRad 产品; anti-HA、anti-JunB 及 Smad2/3 抗体分别为 Santa Cruz 和 BD 公司产品; PVDF 膜和免疫印迹所用二抗、三抗及 ECF 增强发光系统均为 Amersham Pharmacia Biotech 产品; 荧光酶双报告分析系统 (Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System) 为 Promega 公司产品; TGF- β 1 为 R&D 公司产品. Mv1Lu (貂肺上皮细胞) 为本实验室保存, 于 10% 胎牛血清 (FBS, Gibico) 的 DMEM 培养基, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 细胞转染采用 LipofectinAmin2000 (Invitrogen 公司).

1.2 方法

1.2.1 四环素调控系统细胞系的建立. 首先将带有新霉素抗性基因 (Neo^r) 的 pTet-off 质粒转染进 Mv1Lu 细胞, 极限稀释后培养于 96 孔板中, 以含 2 g/L 新霉素 (G418) 的培养基筛选稳定表达 pTet-off

*国家自然科学基金资助项目 (30470888), 国家重点基础研究发展规划项目 (973)(2001CB510006, 2002CB51300) 和裕元基金资助项目 (20240005-06).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62785076, Fax: 010-62773624

E-mail: zhijie@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2005-01-04, 接受日期: 2005-02-28

基因的细胞克隆. 瞬时转染带有荧光素酶报告基因的四环素响应元件 (pTRE₂/Luc) 表达质粒到上述细胞克隆中, 通过荧光素酶报告基因活性筛选、鉴定出诱导活性高而本底最小, 即受四环素严格控制调节的细胞克隆作为下一轮转染、筛选 CHIP 的源细胞株 (pTet-off-Mv1Lu). 将带有 HA 标签的 pTRE₂/HA-CHIP 表达质粒与潮霉素抗性基因 (pTK/Hyg) 共同转染上述 pTet off-Mv1Lu 源细胞株中, 以含 2 g/L G418 和 0.3 g/L 潮霉素 (Hyg) 的培养基培养、筛选 (同时持续加上 0.2 g/L 四环素以抑制 CHIP 基因的表达), 单克隆细胞出现后, 撤除四环素, 免疫印迹检测、鉴定 CHIP 基因表达.

1.2.2 免疫印迹. 等量细胞培养在含或不含有四环素培养基, 直径为 35 mm 的培养盘中, 48 h 后收获细胞. 200 μ l 全细胞裂解液 (400 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 10% 甘油, 1 mmol/L PMSF, 0.5% NP-40, 蛋白酶体抑制剂) 于冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 于 4℃ 离心 10 min. 定量样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后进行免疫印迹, 具体操作步骤参照文献[4~7]进行.

1.2.3 荧光素酶报告分析 (luciferase assay). 根据实验设计组别, 把响应 TGF- β 信号的报告质粒 (CAGA)₁₂-Luc 和内参质粒 pRL-TK 转染至分别培养在含或不含四环素培养基的 12 孔板中, 6 h 后加入 7.5 μ g/L 的 TGF β 1, 继续培养 18 h, 收获细胞. 每孔加入 150 μ l 细胞裂解液, 室温轻微振荡 15 min. 在荧光素酶报告分析仪 (Top Count) 专用检测板的每个孔中加入 30 μ l 荧光素酶催化底物, 再加入 10 μ l 上述细胞裂解物, 混匀, 测定荧光素酶活性. 每次试验重复 3 次, 所有数据都经 Promega

双报告系统的内参 (pRL-TK) 校正后进行统计学分析.

1.2.4 JunB 基因诱导表达. 受四环素调控稳定表达 CHIP 的细胞克隆, 培养在含或不含有四环素培养基直径为 35 mm 的培养盘中, 24 h 后加入 TGF- β 1 (7.5 μ g/L) 继续培养, 分别于 4、20 h 收获细胞, 裂解, 免疫印迹检测 JunB 基因的表达.

2 结 果

2.1 四环素调控表达细胞系的构建

稳定表达 pTet-off 的 Mv1Lu 细胞经瞬时转染 pTRE₂/Luc, 鉴定出荧光素酶活性本底低而诱导率超过本底 20 倍以上的 5 个独立克隆 (结果未显示), 将 pTK/Hyg 和 pTRE₂/HA-CHIP 共转染至受四环素调控最优的一株细胞中, G418 和 Hyg 双重筛选得到 25 个细胞单克隆. 将等量细胞分别培养于含有和不含 2 mg/L 四环素的培养液中, anti-HA 抗体进行免疫印迹检测. 图 1a 显示其中的 3 个克隆, 可以看出, 四环素处理的细胞用 anti-HA 抗体未检测到 HA-CHIP 蛋白的表达 (1, 3, 5 列), 即四环素的存在抑制了 HA-CHIP 的表达, 而去除四环素后则检测到明显的 HA-CHIP 阳性条带 (2, 4, 6 列), 显示该细胞中 HA-CHIP 蛋白的表达受到四环素的严格调控. 为进一步观察四环素浓度对 HA-CHIP 诱导表达的剂量控制效应, 将细胞置于四环素浓度逐渐递减的培养基中培养. 图 1b 结果显示, 四环素浓度为 2 mg/L 时 CHIP 的表达被完全抑制, 而随着四环素浓度的降低, HA-CHIP 表达量逐渐升高, 在四环素浓度为零时 HA-CHIP 最大量表达, 这说明该细胞中的 HA-CHIP 表达受四环素浓度的调节, 具有剂量依赖性.

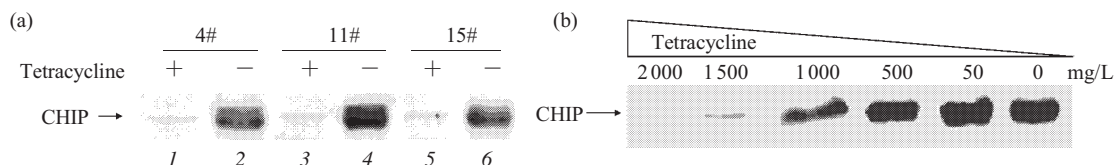


Fig.1 Tetracycline regulated expression of HA-CHIP in stably transfected cell clones

(a) Stably transfected cell clones were grown in the presence (Tet⁺) or absence (Tet⁻) of 2 mg/L of tetracycline. (b) Stably transfected cells (11#) were grown in the presence of different concentrations of tetracycline for 48 h. Western blot was performed with anti-HA antibody.

2.2 CHIP 降低细胞内 Smad2/3 蛋白水平

为观察 CHIP 对 Smad 蛋白水平的影响, 将上述受四环素严格调控的细胞分别培养在含有和不含有四环素的培养基中, 72 h 后免疫印迹检测细胞内

源性 Smad2/3 蛋白水平. 从图 2 结果可以发现: 在四环素存在的状态下, HA-CHIP 的表达受到严格抑制而无任何表达 (中排 1~4), 此时细胞内源性 Smad2/3 蛋白有较高的表达水平 (上排 1~4); 撤

除四环素后, HA-CHIP 恢复了高表达(中排 5~8), 但此时细胞内源性 Smad2/3 蛋白水平则显著降低(上排 5~8). β -Actin 蛋白在两种不同处理的细胞中则没有明显变化. 以上的结果说明 HA-CHIP 蛋白的高表达降低了细胞内 Smads 蛋白的水平.

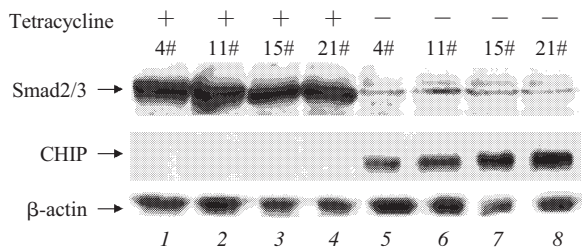


Fig.2 CHIP decreased Smad2/3 protein level in tetracycline controlled Mv1Lu cells

Stably transfected cell clones (4#, 11#, 15#, 21#) were grown with (Tet⁺) or without (Tet⁻) 2 mg/L of tetracycline for 72 h. Smad and HA-CHIP protein expression were detected by Western blot with anti-Smad2/3 and anti-HA antibody, respectively.

2.3 CHIP 抑制 Smads 介导的基因转录

以上免疫印迹结果可以看出, CHIP 的过量表达降低了细胞内 Smad2/3 蛋白水平. Smads 是 TGF- β 通路中的重要胞内信号传递蛋白. 因此, CHIP 降低 Smad2/3 蛋白水平可能会影响 Smad2/3 介导的下游基因转录活性. 为了观察这种可能性, 我们采用含有 Smads 结合元件且下游带有荧光素酶基因的报告系统, 在 CHIP 过量表达的情况下观

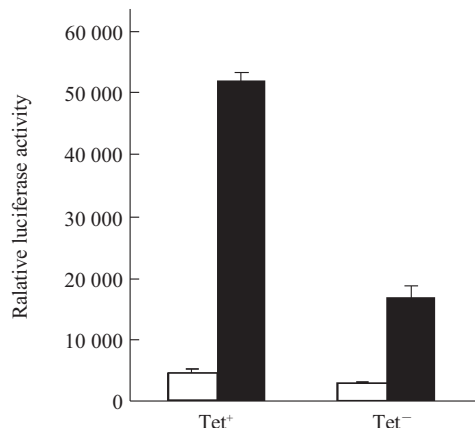


Fig.3 CHIP inhibited Smads induced gene transcription

CHIP inhibited transcription activity induced by Smads in tetracycline controlled Mv1Lu cell. Stably transfected cell clone (11#) was transiently transfected with (CAGA)₁₂-Luc gene and grown in the presence (Tet⁺) or absence (Tet⁻) of 2 mg/L of tetracycline for 48 h. The cells were lysed and luciferase activity was assayed according to the manufacturer's instructions. The data are presented as relative values normalized with internal control. The standard derivations are shown based on 3 repeat results. □: -TGF- β ; ■: +TGF- β .

察 TGF- β 所诱导的 Smads 基因转录活性的变化. 从图 3 结果可以看出, 在四环素存在抑制 HA-CHIP 表达时, TGF- β 可显著开启下游荧光素酶报告基因的表达, 活性较对照组升高 13 倍(左), 而撤除四环素使 HA-CHIP 过量表达以后, TGF- β 对下游荧光素酶报告基因的激活效应明显降低(不到 2 倍), 显示 CHIP 可以降低 Smads 介导的基因转录活性.

2.4 CHIP 下调 TGF- β 响应基因 JunB 的表达

上述荧光素酶报告实验结果提示 CHIP 能够抑制 Smads 基因转录活性. JunB 是 TGF- β 的早期响应基因, 为了进一步观察 CHIP 的过表达对 TGF- β 下游响应基因表达的影响, 我们测定了 JunB 蛋白表达水平的变化. 从图 4 的结果可以看出, 当四环素存在抑制 HA-CHIP 的过量表达时, 7.5 μ g/L TGF- β 1 处理 4 h 就可以诱导 JunB 的显著表达(上排 2 列), 而撤除四环素使 HA-CHIP 过量表达时(中排 4~6), 细胞中的 JunB 表达明显受到抑制(上排 5 列), TGF- β 1 处理 20 h 也得到同样的结果(3, 6 列). 这表明 CHIP 的存在的确影响了 TGF- β 对下游基因的诱导, 使细胞对 TGF- β 1 的响应明显降低, 此结果进一步说明了 CHIP 对 TGF- β 信号通路具有抑制性调节功能.

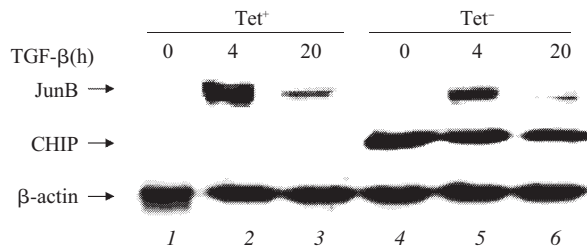


Fig.4 CHIP inhibited JunB gene expression

Stably transfected cell clone (11#) was grown in the presence (Tet⁺) or absence (Tet⁻) of 2 mg/L of tetracycline for 48 h and then treated with TGF- β 1 (7.5 mg/L) for another 4 or 20 h as indicated. The cells were lysed and subjected to 10% SDS-PAGE and Western blot was carried out using the appropriate antibodies.

3 讨 论

TGF- β 是迄今为止了解的功能最复杂的细胞因子之一. 尽管目前已发现许多信号分子从各个水平调节 TGF- β 信号^[5-13], 但在信号转递过程中, 仍有许多分子机制没有被彻底的阐明, 仍存在许多未知的调节蛋白可能对信号的传递起着重要的作用. 研究并发现这些相互作用蛋白, 是人们能够真正认识和阐明 TGF- β 信号传递途径的前提, 也是为从分子水平上认识相关疾病的发生发展提供理论基础.

我们的前期工作发现了伴侣相互作用蛋白 CHIP 与 Smads 蛋白相互作用并抑制性调节 TGF- β /BMP 信号通路^[4,6,7]。目前相关研究显示, CHIP 可作为分子伴侣 Hsp70/90 的协同作用蛋白参与多种蛋白质的折叠和降解过程, 如糖皮质激素受体 GR (glucocorticoid receptor)、CFTR (cystic-fibrosis transmembrane-conductance regulator) 及 ErbB2 等^[14-16], 但其确切的生理功能并未得到彻底的阐明, 本研究建立了可调控 CHIP 表达的稳定细胞系, 并以此为细胞模型研究了 CHIP 对 TGF- β 信号通路的调控作用。

准确、定时地调控外源基因表达对其在信号通路中的具体功能十分重要。受四环素精确调控表达 CHIP 的细胞系, 克服了单纯长期过量表达 CHIP 基因对细胞内环境所造成的影响, 在此状态下研究基因调控具有更准确和更接近生理条件的优越性。Smad2/3 是 TGF- β 通路中的重要胞内递承蛋白, 在四环素调控的细胞系中, 我们发现 CHIP 蛋白的高表达使细胞内 Smad2/3 蛋白水平得到显著的降低, 提示 CHIP 可能是通过影响 Smads 蛋白水平而参与调节 TGF- β 信号通路。由此, 我们采用荧光素酶报告系统观察 HA-CHIP 对 Smads 介导的基因转录活性的影响。(CAGA)₁₂-Luc 是响应 Smads 的报告系统, 该报告系统的启动子上含有 12 个重复的 Smads 结合核苷酸序列, 下游含有荧光素酶报告基因, TGF- β 刺激可高效启动该系统, 引起下游荧光素酶基因的表达。将报告系统表达质粒转染进该细胞系, 并通过四环素的添加与否来控制 HA-CHIP 的表达, 发现 HA-CHIP 蛋白的表达明显降低 TGF- β 信号下游荧光素酶基因的转录活性, 显示 HA-CHIP 对该通路具有抑制性调节作用。如果细胞内过量表达 CHIP 使 Smads 蛋白水平降低, 转录活性降低, 对 TGF- β 通路具负向调控作用, 那么进而将会使细胞对 TGF- β 信号的响应受到抑制。JunB 是 TGF- β 的早期响应基因, 正常情况下短时间内(4 h)可以被 TGF- β 所诱导。我们发现在撤除四环素恢复 CHIP 表达后 Mv1Lu-Tet off-CHIP 细胞系中 JunB 表达水平也明显受到下调(图 4), 这表明 HA-CHIP 的存在影响了 TGF- β 信号的作用, 使细胞对 TGF- β 的响应明显降低, 也进一步说明 CHIP 对 TGF- β 信号通路具有抑制性的调节作用。

CHIP 对 TGF- β 信号通路的抑制性调节究竟涉及何种机制? 本小组目前研究发现, CHIP 可以降低 Smads 蛋白水平, 很有可能是通过对 Smad 蛋白

的降解得以实现^[4,7]。从 CHIP 蛋白结构特点也可以看到, 其含有 U-box 这一重要结构域, 提示 CHIP 可能与蛋白质降解相关。近年来的研究报道也显示 CHIP 可以作为泛素系统的 E3 连接酶, 同时参与调节某些蛋白质的泛素化降解过程^[17,18], 但未见任何报道显示 CHIP 可以参与 TGF- β 信号通路的调节。我们目前的工作发现, CHIP 蛋白的表达可以降低细胞内 Smads 蛋白水平, 由 CHIP 蛋白的独特结构也提示 CHIP 很可能也是通过泛素化途径介导蛋白质的降解而影响 Smads 蛋白水平, 进而对 TGF- β 信号转导呈现抑制性调节, 相关研究正在进行。

TGF- β 信号通路的调控, 尤其是对 Smads 蛋白的抑制性调控也一直是人们关注的热点。我们的研究首次构建了可以调控表达的 CHIP 蛋白的真核细胞表达体系, 通过一系列研究验证了 CHIP 在 TGF- β 通路中可能的调节功能, 为 TGF- β 信号的抑制性调控机制研究增添了新的证据。TGF- β 信号系统对机体有十分复杂而多样的调节, 同时与胞内其他信号通路如 JAK-STAT, Wnt, cAMP/PKA 等也在不同环节有着精密的“交叉作用”, 很多疾病过程与 TGF- β 信号的过度激活或抑制密切相关^[19-21]。因此, 发现新的抑制性分子调控 TGF- β 信号通路及其调控机理的探讨, 对我们从分子水平上认识疾病的病理机制及寻找相应的治疗药物具有极其重要的意义。

致谢 感谢美国 Duke 大学王小凡教授提供 (CAGA)₁₂-Luc 质粒。感谢美国 Indiana 大学傅新元教授, Baylor 医学院冯新华副教授及王小凡教授在我们实验过程中给予的有益指导。

参考文献

- 1 张平, 王金泉. 转化生长因子- β 族信号的转导. 生物化学与生物物理进展, 2000, **27** (4): 375~378
Zhang P, Wang J Q. Prog Biochem Biophys, 2000, **27** (4): 375~378
- 2 Massague J, Blain S W, Lo R S. TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. Cell, 2000, **103**: 295~309
- 3 Ballinger C A, Connell P, Wu Y, *et al.* Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. Mol Cell Biol, 1999, **19** (6): 4535~4545
- 4 Li L Y, Xin H, Xu X L, *et al.* CHIP mediates degradation of Smad proteins and potentially regulates Smad-induced transcription. Mol cell Biol, 2004, **24** (2): 856~864
- 5 徐夏莲, 辛宏, 李林钰, 等. Hsp/Hsc70 相互作用蛋白 CHIP 在大

- 鼠肾纤维化组织中的高表达. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, **20** (3): 347~351
- Xu X L, Xin H, Li L Y, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2004, **20** (3): 347~351
- 6 徐夏莲, 辛 宏, 王春华, 等. 序列特异的双链 RNA 可解除 CHIP 对 TGF- β 信号通路的抑制作用. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, **20** (4): 445~450
- Xu X L, Xin H, Wang C H, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2004, **20** (4): 445~450
- 7 Xin H, Xu X L, Li L Y, *et al.* CHIP controls the sensitivity of TGF-signaling by maintaining the basal level of Smad3 through ubiquitin-mediated degradation. J Biol Chem, 2005, **280** (21): 20842~20850
- 8 Shen X, Hu P P, Liberati N T, *et al.* TGF- β -induced phosphorylation of Smad3 regulates its interaction with coactivator p300/CREB-binding protein. Mol Biol Cell, 1998, **9**: 3309~3319
- 9 Akiyoshi S, Inoue H, Hanai J, *et al.* c-Ski acts a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- β signaling through interaction with Smads. J Biol Chem, 1999, **274**: 35269~35277
- 10 Bonni S, Wang H R, Causing C G, *et al.* TGF- β induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. Nat Cell Biol, 2001, **3**: 587~595
- 11 Bai R Y, Koester C, Ouyang T, *et al.* SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGF- β signalling. Nat Cell Biol, 2002, **4** (3): 181~190
- 12 Lin X, Liang M, Feng X H. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor- β signaling. J Biol Chem, 2000, **275**: 36818~36822
- 13 Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, *et al.* Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. J Biol Chem, 2001, **276**: 12477~12480
- 14 Connell P, Ballinger C A, Jiang J, *et al.* The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. Nat Cell Biol, 2001, **3** (1): 93~96
- 15 Meacham G C, Patterson C, Zhang W, *et al.* The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. Nat Cell Biol, 2001, **3** (1): 100~105
- 16 Xu W, Marcu M, Yuan X, *et al.* Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99**: 12847~12852
- 17 Imai Y, Soda M, Hatakeyama S, *et al.* CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. Mol Cell, 2002, **10**: 55~67
- 18 Makoto U, Junko K, Minako T, *et al.* CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. J Neurochem, 2004, **90**: 231~244
- 19 Nishita M, Hashimoto M K, Ogata S, *et al.* Interaction between Wnt and TGF- β signalling pathways during formation of Spemann's organizer. Nature, 2000, **403**: 781~785
- 20 Ishitani T, Ninomiya K, Tsuji J, *et al.* The TAK1-NLK-MAPK related pathway antagonizes signalling between β -catenin and transcription factor TCF. Nature, 1999, **399**: 798~802
- 21 Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, *et al.* Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. Science, 1999, **284**: 479~482

Tetracycline Controlled CHIP Expression Inhibits TGF- β Signal Pathway*

XU Xia-Lian, XIN Hong, ZHANG Xin-Jun, REN Fang-Li, WANG Yin-Yin, CHANG Zhi-Jie**

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Institute of Biomedicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract To investigate the regulatory function of chaperone interacting protein CHIP in TGF- β signal pathway, a tetracycline induced CHIP expression stable cell line (Mv1Lu-Tet off-CHIP) was generated. In this cell line model, it was observed that overexpression of CHIP dramatically reduced the endogenous Smad2/3 protein level. Luciferase reporter analysis showed that CHIP inhibited the Smads induced transcription activity. Furthermore, Western blot results indicated that CHIP could downregulate gene expression of JunB, a quick response gene induced by TGF- β . These results provided new evidences that CHIP might be a novel signal protein negatively regulating TGF- β signal pathway.

Key words tetracycline control, CHIP, transforming growth factor- β (TGF- β), Smad2/3, JunB, inhibition

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (37470888), The Special Funds for Major State Basic Research of China (2001CB510006, 2002CB51300) and Yuyuan Foundation (202400005-06).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62785076, E-mail: zhijiec@tsinghua.edu.cn

Received: January 4, 2005 Accepted: February 28, 2005