

慢病毒介导的 SPARC 基因沉默对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖凋亡的影响

李茜,李心怡,李小静,朱晓璇,丁以春

摘要 **目的** 观察慢病毒介导的 SPARC 基因沉默对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响并初步探讨其影响机制。**方法** 将携带 SPARC shRNA 的慢病毒载体(LV2N-shRNA-SPARC, sh-SPARC 组)及空载体(LV2-NC, sh-NC 组)转染人瘢痕疙瘩成纤维细胞(HKF),以未作任何处理的成纤维细胞为空白对照组,应用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 分别检测 SPARC mRNA 和蛋白的表达。四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT)检测各组细胞的增殖情况;流式细胞仪法测定 HKF 细胞周期及细胞凋亡;Western blot 检测各组细胞中 TGF- β 1 及 T β R I 的表达。**结果** ① SPARC-shRNA 慢病毒载体感染 HKF 后,sh-SPARC 组细胞中 SPARC mRNA 和蛋白表达量明显低于 sh-NC 组和空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);② MTT 结果显示,与对照组相比,sh-SPARC 组细胞增殖减慢($P < 0.05$);③ 流式细胞术结果显示,sh-SPARC 组成纤维细胞进入 S 期的比例低于 sh-NC 组和空白对照组($P < 0.05$);细胞凋亡率较对照组增加($P < 0.05$);④ Western blot 结果显示,sh-SPARC 组 TGF- β 1 及 T β R I 的蛋白表达水平明显降低。**结论** SPARC 基因沉默能抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖,阻滞细胞周期进程,促进凋亡,其机制可能与 TGF- β 信号通路的下调有关。

关键词 慢病毒;富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白;瘢痕疙瘩;成纤维细胞;转化生长因子- β

中图分类号 R 619.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0944-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.018

富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)是一种胶原结合蛋白,能够影响胶原细胞外基质的组装和转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的活性^[1]。研究^[2]表明,SPARC 在多种纤维性病变组织中均呈现高表达。瘢痕疙瘩是一种病因不明的皮肤纤维过度增生性疾病,与肺、心脏纤维化等纤维性

疾病具有相似的胶原细胞外基质组装和 TGF- β 活化过程。课题组先前的研究^[3-4]表明病理性瘢痕中 SPARC 表达高于正常皮肤;经外源性 SPARC 处理的 HKF 显示出明显的增殖迹象,在兔耳瘢痕中注射 SPARC,其成纤维细胞增殖和胶原沉积明显增加。先前研究表明 SPARC 与瘢痕疙瘩的形成具有相关性,但具体的作用机制仍不清楚。

该研究构建了 SPARC 慢病毒干扰载体感染 HKF,观察沉默 SPARC 基因对瘢痕疙瘩成纤维细胞生物学特性的影响。同时,拟通过检测细胞中 TGF- β 1 及其 I 型受体(T β R I)的蛋白表达情况,初步探讨形成这一影响的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料 重组慢病毒 LV2N-NC 和 LV2N-shRNA-SPARC 干扰载体由上海吉玛基因生物技术有限公司合成并鉴定,在 293 T 细胞中进行包装及滴度测定。DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司),TRIzol 试剂、逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司),MTT 试剂、AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),兔抗人 TGF- β 1、TGF- β Receptor I 抗体、重组人 SPARC 蛋白(美国 R&D 公司)。5 例组织标本来自安徽医科大学第一附属医院整形外科,手术切除的典型瘢痕疙瘩(其中耳垂 3 例,肩部 2 例),取材标本术前均未接受药物及其他治疗且均获得本人或其监护人同意。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将瘢痕疙瘩标本剪去表皮和皮下组织,切成 2~3 mm³ 的组织块,采用组织块贴壁法进行瘢痕疙瘩成纤维细胞的原代培养,以含 20% 胎牛血清、双抗(青霉素 100 U/ml + 链霉素 100 U/ml)的高糖 DMEM 培养基,于 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 慢病毒感染 HKF 细胞和分组 取对数生长期的 HKF 细胞以胰酶消化,计数后以 1×10^5 个/孔接种到 6 孔板中,将细胞分为 3 组:其中未做任何处理的 HKF 细胞为空白对照组,转染空载质粒的

2022-04-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:9021548201)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

作者简介:李茜,女,硕士研究生;

李小静,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail:lixiaojing5@163.com

HKF 细胞为 sh-NC 组,转染 SPARC shRNA 重组慢病毒载体质粒的 HKF 细胞为 sh-SPARC 组。转染过程严格参照慢病毒转染手册,转染后筛选并收集稳定转染的 HKF 细胞。

1.2.3 qRT-PCR 检测 SPARC 基因表达 提取 HKF 细胞中总 RNA,逆转录得 cDNA。以 GAPDH 为内源性参照,以 SYBR Green 染料法利用 qRT-PCR 检测系统,进行 PCR 扩增。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 SPARC mRNA 的相对表达量。SPARC 上游引物序列为 5'-TGAGGTATCTGTGGGAGCTAATC-3',下游引物序列为 5'-CCTTGCCGTGTTTGCAGTG-3',产物长度 128 bp;GAPDH 上游引物序列 5'-AATCCCATCACCATCTTC-3',下游引物序列 5'-AGGCTGTTGT-CATACTTC-3',产物长度 218 bp。

1.2.4 Western blot 检测 SPARC 蛋白的表达 提取各组细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。制备好的蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h 后,加入 1:1 000 稀释的 SPARC 抗体 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜后加二抗室温孵育 2 h,再次洗膜后进行 ECL 显色。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期的各组细胞,以 3 000/孔接种于 96 孔板,分别培养 24、48、72、96 h 后于每孔加入 20 μ l MTT 溶液,37℃ 体积分数 5% CO_2 培养箱孵育 4 h 后弃上清液。在避光操作下每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜,摇床混匀 10 min,酶标仪检测 490 nm 波长各孔吸光度 OD 值。每组 5 个复孔。实验独立重复 3 次。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期及细胞凋亡 转染后的各组 HKF 细胞以胰酶消化,离心收集细胞,调整细胞悬液密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,加入预冷的 70% 的乙醇 4℃ 固定 24 h,离心弃上清液,PBS 洗涤细胞 2 次。加入配置好的碘化丙啶 (PI) 染色液,37℃ 避光温浴 30 min 后用流式细胞仪检测细胞周期比例。另取 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个重悬的细胞,离心沉淀后加入 195 μ l 结合缓冲液重悬细胞,然后加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI,混匀后避光室温孵育 20 min,随后立即上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.7 Western blot 检测 TGF- β 1 及 T β R I 蛋白的表达 分别收集人瘢痕疙瘩成纤维细胞空白对照组,sh-NC 组和 sh-SPARC 组细胞,提取细胞总蛋白并进行蛋白定量。制备好的蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h 后,加入 1:1 000 稀释的 TGF- β 1 及 TGF- β Receptor I 抗体 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜后

加入相应二抗,室温孵育 2 h,再次洗膜后进行 ECL 显色,以 GAPDH 为内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),两两比较采用 Tukey 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组慢病毒感染人瘢痕疙瘩成纤维细胞后 SPARC mRNA 和蛋白的表达 sh-SPARC 组 HKF 细胞中 SPARC mRNA 的相对表达水平明显低于空白对照组和 sh-NC 组 ($n = 3, F = 45.56, P = 0.0002$),见图 1;空白对照组和 sh-NC 组之间 SPARC mRNA 相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);Western blot 检测也得到了相同结果,SPARC 基因在蛋白水平的变化与其在 mRNA 水平表达变化一致。见图 2。

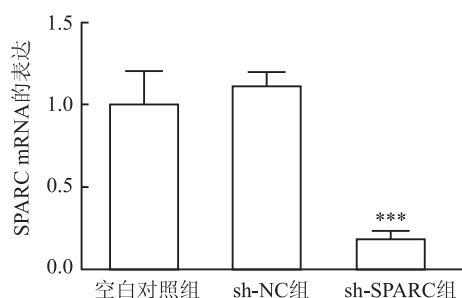


图 1 3 组细胞中 SPARC mRNA 相对表达水平比较
与空白对照组比较: *** $P < 0.001$

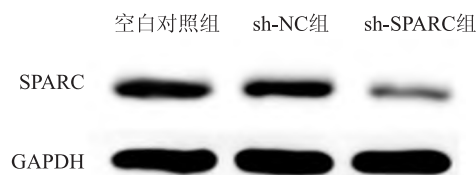


图 2 3 组细胞中 SPARC 蛋白的表达

2.2 SPARC 对 HKF 细胞增殖的影响 对每组细胞分别培养 24、48、72、96 h 后观察,可见转染 SPARC 干扰载体的人瘢痕疙瘩成纤维细胞,其增殖效应较空白对照组有所减缓 ($n = 5, F = 8.47, P = 0.0106$),空白对照组和 sh-NC 组比较,在 490 nm 吸光度 OD 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

2.3 SPARC 对 HKF 细胞周期的影响 流式细胞术检测结果显示,sh-SPARC 组的 HKF 细胞进入 S 期的比例有所减少 ($n = 3, F = 105.00, P < 0.05$), G_0/G_1 期细胞百分比高于空白对照组与 sh-NC 组 (n

$=3$, $F=40.45$, $P=0.0003$), 空白对照组与 sh-NC 组各时期细胞百分比比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。见表 1。

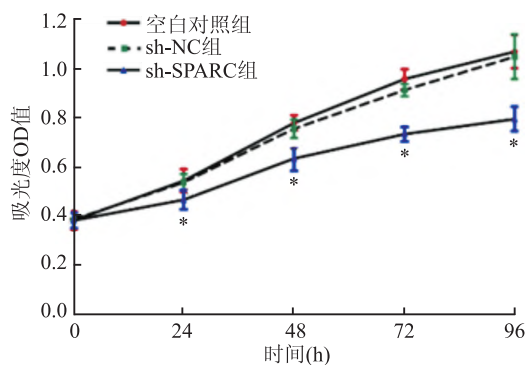


图3 MTT 法检测人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖结果
与空白对照组比较: * $P<0.05$

表1 流式细胞仪分析人瘢痕疙瘩成纤维细胞周期结果($\bar{x} \pm s$, %)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
空白对照	64.20 ± 1.73	18.06 ± 1.33	15.03 ± 0.85
sh-NC	63.43 ± 2.45	19.03 ± 1.10	14.66 ± 1.36
sh-SPARC	75.90 ± 1.35 ***	8.19 ± 0.33 ***	13.18 ± 1.27

与空白对照组比较: *** $P<0.001$

2.4 SPARC 对 HKF 细胞凋亡的影响 sh-SPARC 组 HKF 细胞凋亡率高于空白对照组和 sh-NC 组, ($n=3$, $F=171.08$, $P<0.05$); 空白对照组和 sh-NC 组 HKF 细胞凋亡率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 4。

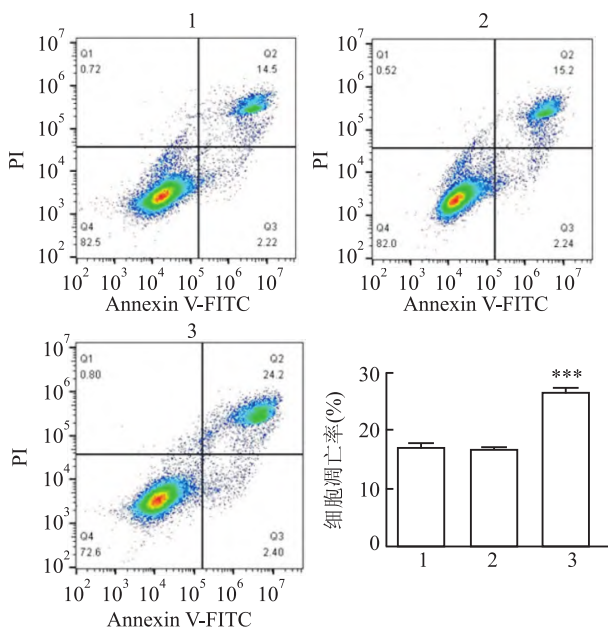


图4 流式细胞仪分析 HKF 凋亡率

1: 空白对照组; 2: sh-NC 组; 3: sh-SPARC 组; 与空白对照组比较: *** $P<0.001$

2.5 SPARC 对 HKF 细胞中 TGF- β 1 及 T β R I 蛋白表达的影响 Western blot 的检测结果显示 sh-SPARC 组 HKF 细胞中 TGF- β 1 及 T β R I 蛋白的表达较空白对照组和 sh-NC 组降低, 空白对照组和 sh-NC 组间差异无统计学意义。见图 5。

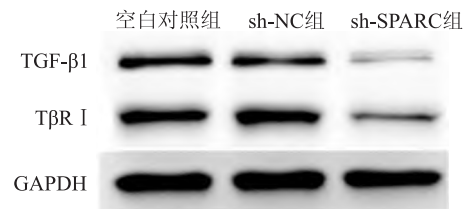


图5 3 组 HKF 中 TGF- β 1 及 T β R I Western blot 结果

3 讨论

瘢痕疙瘩是易感个体的正常伤口愈合紊乱的结果, 其病变明显超出受损区域边界, 向周围正常皮肤呈浸润性生长, 且这种异常增长持续存在^[5]。该病严重影响患者的生活质量, 若长在关节部位还有可能对运动功能产生影响。复杂多样的疾病成因和巨大的个体差异使得瘢痕疙瘩的防治在临床中依然难以攻克。

SPARC 是一种基质细胞糖蛋白, 它可以通过与细胞外基质结构成分和生长因子的结合来调节细胞间的相互作用^[6]。SPARC 已被证实和多种纤维化疾病相关^[7]。瘢痕疙瘩实质是皮肤的纤维过度增生性疾病, 先前的研究^[3]在细胞和组织水平初步比较 SPARC 在正常皮肤、增生性瘢痕和瘢痕疙瘩中的表达情况, 结果显示, SPARC 在瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达水平高于正常皮肤; 经体外培养的瘢痕疙瘩及正常皮肤成纤维细胞与重组人 SPARC 蛋白共培养后, 其成纤维细胞的增殖加快, 且 TGF- β 1 的蛋白表达较对照组增加, 并且浓度越高这种效应也越显著^[4], 提示 SPARC 基因的激活或过表达可能是瘢痕疙瘩形成的重要因素, 但其具体的作用机制尚不明确。

TGF- β 是目前已知与瘢痕形成关系最密切的促纤维化细胞因子之一^[8], 其中 TGF- β 1 最为关键^[9]。TGF- β 1 及其受体在瘢痕疙瘩组织和成纤维细胞中高度表达, 同时与正常皮肤成纤维细胞相比, 瘢痕疙瘩成纤维细胞对 TGF- β 1 更为敏感, 高表达的 TGF- β 1 通过刺激成纤维细胞增殖并促进其合成胶原蛋白、纤连蛋白等细胞外基质成分, 同时诱导蛋白酶抑制剂如纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1) 和金属蛋白酶组织抑制剂 1 (TIMP1) 的表达, 抑制细胞外基

质的降解,导致细胞外基质的合成与降解失衡,使得以胶原为主细胞外基质在真皮内过度沉积,最终导致瘢痕疙瘩的形成^[10-11]。有研究^[12-13]表明 SPARC 通过 TGF- β 受体及 Smad2/3 依赖通路刺激 TGF- β 信号系统是与 SSc 患者纤维化相关的一个重要机制;将 SPARC 添加到 SPARC 缺失的系膜细胞中可诱导 TGF- β 1 的产生^[14];在人正常皮肤成纤维细胞中用小干扰 RNA (siRNA) 特异性抑制 SPARC 基因能够降低 I 型胶原的表达,减少细胞外基质沉积,并减弱 TGF- β 1 的促纤维化作用^[15]。

该研究推测在瘢痕疙瘩的形成过程中,SPARC 同样通过 TGF- β 1/Smads 信号通路发挥作用,为了验证这一猜想,并确定能否通过沉默 SPARC 基因来抑制瘢痕疙瘩中成纤维细胞的过度增殖,该研究设计构建了 SPARC 基因慢病毒干扰载体并感染至人瘢痕疙瘩成纤维细胞,成功下调了成纤维细胞中 SPARC mRNA 和蛋白的表达,并通过 MTT 法和流式细胞术检测瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖、凋亡以及细胞周期的变化,结果显示 SPARC 基因的低表达可以明显调低成纤维细胞的增殖速度,阻滞细胞周期进程并增加瘢痕疙瘩成纤维细胞的凋亡率。同时运用 Western blot 实验方法检测在细胞增殖过程中,与 SPARC 蛋白以及瘢痕组织均具有相关性作用的 TGF- β 1 及其受体的量效关系,寻找 SPARC 蛋白影响瘢痕组织形成发展的特定关系。结果显示 SPARC 基因干扰组成纤维细胞中的 TGF- β 1 及 TGF- β I 型受体的水平都有所降低,提示 SPARC 在瘢痕疙瘩形成过程中可能是通过 TGF- β 1 信号系统发挥作用,但对其下游信号分子的影响还有待深入研究。

参考文献

- [1] Bornstein P, Sage E H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, 14(5): 608-16.
- [2] Chen L Z, He C Y, Su X, et al. SPP1 rs4754 and its epistatic interactions with SPARC polymorphisms in gastric cancer susceptibility[J]. *Gene*, 2018, 640: 43-50.
- [3] 刘超华, 李小静, 宁金龙, 等. 富含半胱氨酸的酸性分泌糖蛋白在病理性瘢痕中的表达及其意义[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2010, 6(1): 17-20.
- [4] Weng X J, Li X J, Li X Y, et al. Promotion of fibrosis in skin scar tissue by secreted protein acidic which is rich in cysteine proteins[J]. *J Biomater Tissue Eng*, 2018, 8(11): 1573-9.
- [5] Gupta J, Gantayala S P, Kashyap S, et al. Diagnosis, management, and histopathological characteristics of corneal keloid: a case series and literature review[J]. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, 2016, 5(5): 354-9.
- [6] Brekken R A, Sage E H. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication[J]. *Matrix Biol*, 2001, 19(8): 816-27.
- [7] Wong S L, Sukkar M B. The SPARC protein: an overview of its role in lung cancer and pulmonary fibrosis and its potential role in chronic airways disease[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(1): 3-14.
- [8] Hu H H, Chen D Q, Wang Y N, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 292: 76-83.
- [9] Jagadeesan J, Bayat A. Transforming growth factor beta (TGF- β) and keloid disease[J]. *Int J Surg*, 2007, 5(4): 278-85.
- [10] Li X Y, Chen Z, Li X J, et al. *In vitro* analysis of the role of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 in keloid[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 919-26.
- [11] 田小雨, 李小静, 李心怡, 等. TSG-6 调控 PI3K/Akt-Bcl-2 通路影响人瘢痕疙瘩凋亡机制的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(4): 563-7.
- [12] Schiemann B J, Neil J R, Schiemann W P. SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system[J]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(10): 3977-88.
- [13] Trojanowska M. Molecular aspects of scleroderma[J]. *Front Biosci*, 2002, 7: 608-18.
- [14] Francki A, Bradshaw A D, Bassuk J A, et al. SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(45): 32145-52.
- [15] Zhou X, Tan F K, Guo X, et al. Small interfering RNA inhibition of SPARC attenuates the profibrotic effect of transforming growth factor beta1 in cultured normal human fibroblasts[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(1): 257-61.

Effect of lentivirus-mediated SPARC gene silencing on proliferation and apoptosis of human keloid fibroblasts

Li Xi, Li Xinyi, Li Xiaojing, Zhu Xiaoxuan, Ding Yichun

(Dept of Plastic and Cosmetic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) gene on

持续光照建立斑马鱼失眠模型及评价

冉思邈,夏婧,夏乐旋,王平

摘要 **目的** 利用斑马鱼建立睡眠剥夺模型,为失眠的基础研究提供更多可靠的实用建模参考方案。**方法** 选取4月龄同一批次野生型AB系雄性斑马鱼160尾作为实验对象,随机分为对照组(CK组)和睡眠剥夺1~7 d组(SD1~SD7组)。对照组置于正常14 h/10 h明/暗交替环境,睡眠剥夺组分别利用模拟日光对其进行不同时间的持续光照达到剥夺斑马鱼睡眠的效果。造模结束后,比较各组斑马鱼运动形式、学习记忆能力、生物钟基因表达、脑部超微结构的改变。**结果** 运动形式结果显示:与CK组斑马鱼相比,SD1、SD2、SD3组斑马鱼静息时间均增多($P < 0.05$),SD3组斑马鱼大运动时间及大运动计数较CK组减少($P < 0.05$);学习记忆能力结果显示:CK组斑马鱼学习记忆能力较SD1、SD2、SD3组强,($P < 0.05, 0.01$),SD1组斑马鱼学习记忆能力较SD2、SD3组斑马鱼强(均 $P < 0.01$),SD2组斑马鱼学习记忆能力较SD3组斑马鱼强($P < 0.01$);qRT-PCR结果显示:与CK组相比,SD3组斑马鱼脑部周期蛋白1a(Per1a)、周期蛋白2(Per2)、脑和肌肉组织芳香烃受体核转运蛋白的类似蛋白1

(Bmal1)、隐色素1b(Cry1b) mRNA表达差异有统计学意义($P < 0.05$);电镜结果显示:SD2及SD3组斑马鱼大脑神经元出现神经元坏死现象,镜下可见细胞核塌陷,边界破裂甚至溶解,核染色质固缩,线粒体出现肿胀,甚至大量空泡。**结论** 持续光照3 d可改变斑马鱼运动形式,使其学习记忆能力下降,改变了与睡眠相关的时钟基因表达,诱发了脑部神经元凋亡,可以用来建立斑马鱼失眠模型。

关键词 睡眠剥夺;斑马鱼;光照;失眠动物模型

中图分类号 R 256.23

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0948-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.019

失眠是以频繁而持续的入睡困难和睡眠维持困难并导致睡眠感不满意为特征的一种睡眠障碍。各种原因导致的睡眠不足均对健康有着负面影响^[1]。严重的睡眠障碍不仅影响患者的身心健康,也影响了患者的生活和工作质量,长期失眠对个人和社会造成了严重的负担^[2]。

斑马鱼与人类基因高度同源,可以通过光照、咖啡因、持续流动水流、感官刺激、电刺激、物理摇晃等方式对斑马鱼进行睡眠剥夺^[3-7],但目前尚未见斑马鱼成鱼失眠模型报道。该研究探索建立一种斑马鱼成鱼失眠模型,并通过比较睡眠剥夺后斑马鱼

2022-03-22 接收

基金项目:国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项项目(编号:2018YFC1705600)

作者单位:湖北中医药大学老年医学研究所,武汉 430000

作者简介:冉思邈,女,医学博士;

王平,男,二级教授,主任医师,博士生导师,博士后合作导师,责任作者,E-mail:pwang54@aliyun.com

the proliferation and apoptosis of human keloid fibroblasts and its mechanism *in vitro*. **Methods** The lentiviral vector carrying SPARC shRNA (LV2N-shRNA-SPARC, sh-SPARC group) and empty plasmid (LV2-NC, sh-NC group) were transfected into human keloid fibroblasts (HKF) respectively. Real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were performed to examine the expression of SPARC mRNA and protein in HKF. MTT assay was used to estimate the cell proliferation. The cell cycle and apoptosis of HKF were detected by flow cytometry. The expression of TGF- β 1 and T β R I proteins in HKF were detected by Western blot. **Results** ① After transfection of SPARC shRNA lentiviral vector, the expression of SPARC mRNA and protein in HKF were significantly down-regulated compared with those in the control groups ($P < 0.05$). ② MTT assay showed that the proliferation of sh-SPARC groups decreased compared with the control groups ($P < 0.05$). ③ Flow cytometry results showed that the S phase cell ratios of sh-SPARC groups were reduced while the apoptosis rates increased compared with the control groups ($P < 0.05$). ④ Western blot showed that the protein expression levels of TGF- β 1 and T β R I significantly decreased in sh-SPARC groups. **Conclusion** SPARC gene silencing inhibits the proliferation blocks cell cycle progression and promotes cell apoptosis in HKF, which may be related to the down-regulation of the TGF- β signaling pathway.

Key words lentivirus; secreted protien acidic and rich in cysteine; keloid; fibroblasts; transforming growth factor- β