

姜黄素对肝星状细胞转化生长因子 $\beta 1$ 及受体和 I、III 型胶原 mRNA 表达的影响

赵珍东^{1,2}, 段启^{1,2*}, 姚丽梅^{1,2}, 张雷红^{1,2}, 庄义修^{1,2}

1. 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520

2. 南药资源保护与利用工程技术开发中心, 广东 广州 510520

摘要: 目的 探讨姜黄素对体外培养大鼠肝星状细胞 (HSC) 增殖、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 及其受体、下游信号通路及效应的影响。方法 培养 HSC 细胞, 给予不同浓度姜黄素处理, 采用 MTT 比色法检测 HSC 细胞增殖; Hoechst 33342 染色检测姜黄素对 HSC 凋亡的影响; 采用免疫细胞化学法检测 Smad3、Smad7 蛋白表达; 用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 TGF- $\beta 1$ 及其 I、II 受体 (T β RI、T β RII) 和 I、III 型胶原 (Col-I、Col-III) mRNA 的表达。结果 姜黄素能抑制 HSC 细胞增殖, 诱导 HSC 细胞凋亡, 免疫组化结果显示姜黄素能抑制 HSC 表达 Smad3, 并提高 Smad7 表达, RT-PCR 结果显示姜黄素使 HSC 细胞 TGF- $\beta 1$ 及其 I、II 受体、Col-I、Col-III mRNA 表达降低。结论 姜黄素能抑制 HSC 增殖和活化, 抑制 TGF- $\beta 1$ 及其受体和信号通路, 是其抗肝纤维化的作用机制之一。

关键词: 姜黄素; 肝星状细胞; 转化生长因子 $\beta 1$; 肝纤维化; Smad3; Smad7

中图分类号: R285.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)05-0957-05

Effects of curcumin on mRNA expression of TGF- $\beta 1$, T β RI, T β RII, Col-I, and Col-III in hepatic stellate cells

ZHAO Zhen-dong^{1,2}, DUAN Qi^{1,2}, YAO Li-mei^{1,2}, ZHANG Lei-hong^{1,2}, ZHUANG Yi-xiu^{1,2}

1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China

2. Engineering Center for Protection and Utilization of Herbal Medicinal Resources in South China, Guangzhou 510520, China

Abstract: Objective To observe the inhibition effect of curcumin on hepatic stellate cells (HSC) cell proliferation, mRNA expression of transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta 1$) and its receptors, and signal transduction. **Methods** The proliferation of HSC was examined by MTT colorimetric. The apoptosis of HSC was examined by Hoechst 33342; The mRNA levels of TGF- $\beta 1$, T β RI, T β RII, collagen I (Col-I), and collagen III (Col-III) were examined by RT-PCR; The expression of Smad3 and Smad7 in HSC was examined by immunohistochemical method. **Results** Curcumin could inhibit HSC proliferation and induce HSC apoptosis; What's more, the mRNA levels of TGF- $\beta 1$, T β RI, T β RII, Col-I, and Col-III, and the expression of Smad3 was significantly decreased by curcumin; The expression of Smad7 was remarkably increased. **Conclusion** Curcumin could inhibit the proliferation of HSC, inhibit the expression of TGF- $\beta 1$, and its receptors as well as its signal transduction, which could result in the effect of antihepatic fibrosis.

Key words: curcumin; hepatic stellate cells (HSC); transforming growth factor beta1(TGF- $\beta 1$); hepatic fibrosis; Smad3; Smad7

肝纤维化是慢性肝病发展成肝硬化的共同病理基础, 以产生大量细胞外基质 (ECM) 特别是 I 型胶原 (Col-I) 为主要特征。持续的肝损伤可损害肝实质细胞和枯否细胞, 这些细胞可分泌多种细胞因子, 激活肝星状细胞 (HSC), 使之具有肌成纤维样母细胞表型。研究表明, HSC 活化、增殖是肝纤维化发生发展的中心环节^[1], 转化生长因子 $\beta 1$

(TGF- $\beta 1$) 是已知最强的肝纤维化促进因子之一, 在肝纤维化时有高表达。

姜黄素是从姜黄 *Curcuma longa* L. 中提取的天然色素, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理和生物学作用^[2-5], 可用于慢性肝病、糖尿病等的治疗。前期研究表明, 姜黄素能明显降低肝纤维化大鼠血清透明质酸、III 型前胶原水平, 降低肝组织羟脯氨

收稿日期: 2011-06-06

基金项目: 广东省中医药局项目 (2009276); 广东食品药品职业学院院级项目 (2007012)

作者简介: 赵珍东 (1976—), 男, 四川巴中人, 博士, 讲师, 主要从事中药抗肝纤维化的机制研究。

Tel: (020)28854936 E-mail: Zhaozd2008@126.com

*通讯作者 段启 Tel: (020)28854960 E-mail: Duanq@gdzy.edu.cn

酸的量, 病理组织观察亦证实可改善肝纤维化大鼠病理损害, 具有良好的抗肝纤维化作用^[6], 但姜黄素对肝纤维化发生的关键细胞因子之一 TGF- β 1 的影响尚未见相关研究报道, 本实验观察姜黄素对 HSC 细胞的 TGF- β 1、下游信号通路及效应的影响, 以此探讨姜黄素抗肝纤维化作用的部分机制。

1 材料

1.1 药物

姜黄素, 购自陕西旭煌植物科技有限公司, 经高效液相色谱法检测质量分数达 98%, 批号 XH100301。使用前以少量二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 加入 DMEM 配制成浓度为 10 mmol/L (3.7 g/L) 的贮存液, 超声助溶, 分装, 避光-20 °C 保存, 2 周内使用。实验前用 DMEM 培养基稀释至所需浓度 (DMSO 终体积分数 < 0.1%)。

1.2 细胞

HSC-T6 细胞株, 为 SV40 转染的 SD 大鼠肝星状细胞, 其表现型为活化的 HSC, 表达高水平的 Col-I、金属蛋白酶组织抑制因子-1 (TIMP-1) mRNA 等。

1.3 试剂

MTT, Sigma 公司; 总 RNA 提取试剂 Trizol、RT-PCR 试剂盒、DNA marker, 北京天根生化科技有限公司; TGF- β 1 及受体 I、II (T β RI、T β RII), I、III 型胶原 (Col-I、Col-III) 引物, 由上海英伟创津公司合成; Hoechst 33342 染色液, 上海碧云天生物技术研究所; 抗 Smad3、抗 Smad7 多克隆抗体和生物素链霉菌抗生物素蛋白免疫组化检测试剂盒 (SP 试剂盒), 北京博澳森生物技术有限公司。

1.4 仪器

MK3 型酶标仪、CT14RD 高速台式冷冻离心机、MSC1.2 超净工作台、Model 311CO₂ 培养箱, 美国 Thermo Forma 公司; MyCycler DNA 扩增仪, 美国 Bio-Rad 公司; AlphaImager Mini 凝胶成像系统, 美国阿尔法公司; Leica 荧光显微镜, 德国莱卡公司; 电泳槽, 北京六一仪器厂; ZWF 紫外投射反射分析仪 (上海精科实业有限公司); 倒置相差生物显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 HSC 细胞培养

将冻存细胞置 38 °C 水中快速复温直至完全融化, 接种细胞, 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度下培养。当细胞呈单层致密状时, 0.25% 胰蛋白酶消化后代, 传 3~4 代待细胞生长稳定后开始实验。

2.2 姜黄素对 HSC 细胞增殖的影响

完全培养基混悬细胞, 将细胞悬液以 1×10^5 /mL 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μ L, 细胞培养 24 h 后, 弃去培养基, 换含 1% DMEM 培养基培养 24 h 后, 分别加入终浓度为 10、20、30、40、50、60、80、100、120、140 μ mol/L 姜黄素, 并设空白孔 (不加细胞和药物) 及对照组, 每个浓度设 8 个复孔, 继续培养 24 h, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L, 孵育 4 h。弃培养基, 加入 DMSO 100 μ L/孔, 孵育 5 min, 在酶标仪上测定 450 nm 波长处各孔吸光度 (A_{450}) 值, 计算细胞生长抑制率。实验重复 5 次。

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{\text{实验组 } A_{450}}{\text{对照组 } A_{450}}$$

2.3 姜黄素对 HSC 细胞形态和凋亡的影响

将细胞分成对照组、姜黄素干预组 (终浓度分别为 20、40、80 μ mol/L), 分别加入正常培养基和相应药物, 培养 24 h 后于倒置显微镜下观察 HSC 细胞形态学变化; 细胞爬片用 1 mL PBS 洗涤 2 次, 加入固定液中性甲醛 1 mL 固定 10 min 后, 弃去固定液, 风干, 加入 2 mL Hoechst 33342 稀释液 (1:2 000), 避光, 放入 37 °C 温箱温育 30 min, 及时在荧光显微镜下观察。

2.4 姜黄素对 HSC 细胞表达 Smad3 和 Smad7 的影响

制作细胞爬片, 取硅化玻片, 经紫外消毒后备用。取对数生长期 HSC 细胞, 按“2.3”项方法处理细胞, 实验结束后, 取出盖玻片, PBS 洗涤, 乙醇固定冻存。取出盖玻片粘在载玻片上, 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶, 兔血清封闭液 20 min, 分别滴加抗 Smad3 和 Smad7 多克隆抗体 (终浓度分别为 1:50 和 1:100), 2 h 后滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 20 min 后滴加过氧化物酶标记的链霉亲和素, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片, 显微镜观察。PBS 代替一抗做阴性对照, 棕黄色为阳性染色。每例切片高倍镜下 (40 \times) 至少取 5 个随机视野, 取平均值。免疫组化结果以半定量方法进行评定。评分标准: (1) 染色强度分级: 无显色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。(2) 阳性细胞数分级: 0 分, 阳性细胞数为 0; 1 分, 阳性细胞数 < 30%; 2 分, 阳性细胞数为 30%~50%; 3 分, 阳性细胞数 50%~70%; 4 分, 阳性细胞数 70%~100%。两项分值的乘积为阳性评分。

2.5 RT-PCR 法检测姜黄素对 HSC 细胞 TGF- β 1、T β RI、T β RII、Col-I 和 Col-III mRNA 表达的影响

实验分组、药物干预同“2.3”项, 药物处理 48 h

后, PBS 洗涤, 胰酶消化。细胞总 RNA 抽提并逆转录成 cDNA, 合成引物选用 Oligo dT。逆转录反应: 在 200 μ L PCR 管中, 加入总 RNA 2.5 mL, Oligo dT 2 μ L, dNTP 混合物 2 μ L, RNase Free dH₂O 8 μ L, 70 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 再加入 4 μ L 5 \times First-Strand Buffer, 1 μ L 0.1 mol/L DTT, 0.5 μ L Rnasin, 1 μ L TIANScript M-MLV, 混匀, 42 $^{\circ}$ C 温育 50 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min 终止

反应。PCR 扩增: 取 cDNA 2.5 μ L, 上游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 2 \times Taq Mastermix 12.5 μ L, 加 dd H₂O 至 25 μ L。引物序列、产物片段长度和反应条件见表 1。PCR 产物经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统摄像。通过对凝胶成像图进行灰度值的采集分析, 计算目的基因与内参 GAPDH 的比值, 以此反映目的基因的相对表达水平。

表 1 RT-PCR 引物序列及扩增参数

Table 1 Primers sequences and amplification parameters by RT-PCR

基因	引物序列	退火条件	循环数	产物片段 / bp
TGF- β 1 ^[7]	5'-CGGCAGCTGTACATTGACTT-3' 5'-TCAGCTGCACTTGCAGGAGC-3'	56.5 $^{\circ}$ C, 30 s	32	278
T β RI ^[8]	5'-CGTCTGCATTGCACTTATGC-3' 5'-CTGTGGCAGAATCATGTCTC-3'	55.5 $^{\circ}$ C, 30 s	35	680
T β RII (PP5.0 设计)	5'-GGAGGAAGAACGACAAGA-3' 5'-GGACACGGTAACAGTAGAAG-3'	56.5 $^{\circ}$ C, 30 s	35	312
Col-I ^[9]	5'-GAGCGGAGAGTACTGGATCG-3' 5'-TACTCGAACGGGAATCCATC-3'	54.5 $^{\circ}$ C, 30 s	35	204
Col-III ^[9]	5'-TGGTCCTCAGGGTGTAAAGG-3' 5'-GTCCAGCATCACCTTTTGGT-3'	54.5 $^{\circ}$ C, 30 s	35	482
GAPDH	5'-CTTCCAGGAGCG AGAT-3' 5'-CAGGATGCCCTTTAGT-3'	—	—	592

2.6 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS16.0 统计软件分析, 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 姜黄素对 HSC 细胞增殖的影响

不同浓度的姜黄素对 HSC 细胞的增殖均有抑制作用, 随着姜黄素浓度的增加, 对 HSC 增殖抑制作用也逐渐增强。数据分析表明, 姜黄素对 HSC 细胞的 IC₅₀ 约为 87 μ mol/L, 10 μ mol/L 的姜黄素对 HSC 的抑制作用不明显。结果见表 2。

3.2 姜黄素对 HSC 细胞形态和凋亡的影响

倒置显微镜下观察可见, 对照组 HSC 呈梭形或形态不规则, 胞体近中央处有椭圆形的胞核, 胞质内外伸出 2~3 个长短不同的突起, 呈典型的成纤维细胞样表型; 经不同浓度姜黄素作用后, 细胞则逐渐变圆, 体积变小, 部分细胞皱缩、松散易脱落, 培养液中悬浮细胞随药物浓度的增加而增多。细胞生长状态明显受到抑制, 细胞密度则随姜黄素浓度增加而减少。

荧光显微镜下观察可见, 对照组细胞染色为淡蓝色, 呈星形, 体积比较大, 染色质在核内均匀分

表 2 姜黄素对 HSC 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Inhibition of curcumin on proliferation of HSC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	C / (μ mol·L ⁻¹)	A ₄₅₀ 值	抑制率 / %
对照	—	1.17 \pm 0.13	0
姜黄素	10	1.11 \pm 0.11	5
	20	1.01 \pm 0.10*	13
	30	0.93 \pm 0.09**	20
	40	0.84 \pm 0.08**	28
	50	0.76 \pm 0.07**	35
	60	0.71 \pm 0.07**	39
	80	0.63 \pm 0.06**	46
	100	0.50 \pm 0.05**	57
	120	0.45 \pm 0.04**	61
	140	0.35 \pm 0.04**	70

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs control group

布, 无核碎裂现象。经各浓度姜黄素干预后, 部分细胞出现体积变小, 细胞核碎裂, 形成较多的凋亡小体。

3.3 姜黄素对 HSC 细胞 Smad3 和 Smad7 蛋白表达的影响

Smad3、Smad7 的表达主要位于细胞质, 阳性

细胞胞质被染成黄色或棕黄色，阴性细胞胞质为蓝色。对照组 Smad3 蛋白表达率最高，经不同浓度姜黄素干预后，Smad3 阳性表达积分降低，且有一定的剂量依赖性。而 Smad7 的阳性表达且随着姜黄素浓度的增高而增强。可见，姜黄素能上调 Smad7 的表达。与对照组比较，差异均显著，见表 3。

3.4 姜黄素对 HSC 细胞 TGF-β1、TβRI、TβRII、Col-I、Col-III mRNA 表达的影响

对照组 HSC 高度表达 TGF-β1、TβRI、TβRII、Col-I、Col-III，给予不同浓度姜黄素干预后，TGF-β1、TβRI、TβRII、Col-I、Col-III 在 HSC 内的表达不同程度的降低，与对照组比较，差异非常显著 ($P < 0.01$ 、 0.001)。结果说明姜黄素可下调 HSC 细胞 TGF-β1、TβRI、TβRII、Col-I、Col-III mRNA 的表达水平。凝胶电泳图见图 1，半定量结果见表 4。

表 3 姜黄素对 HSC 细胞 Smad3 和 Smad7 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

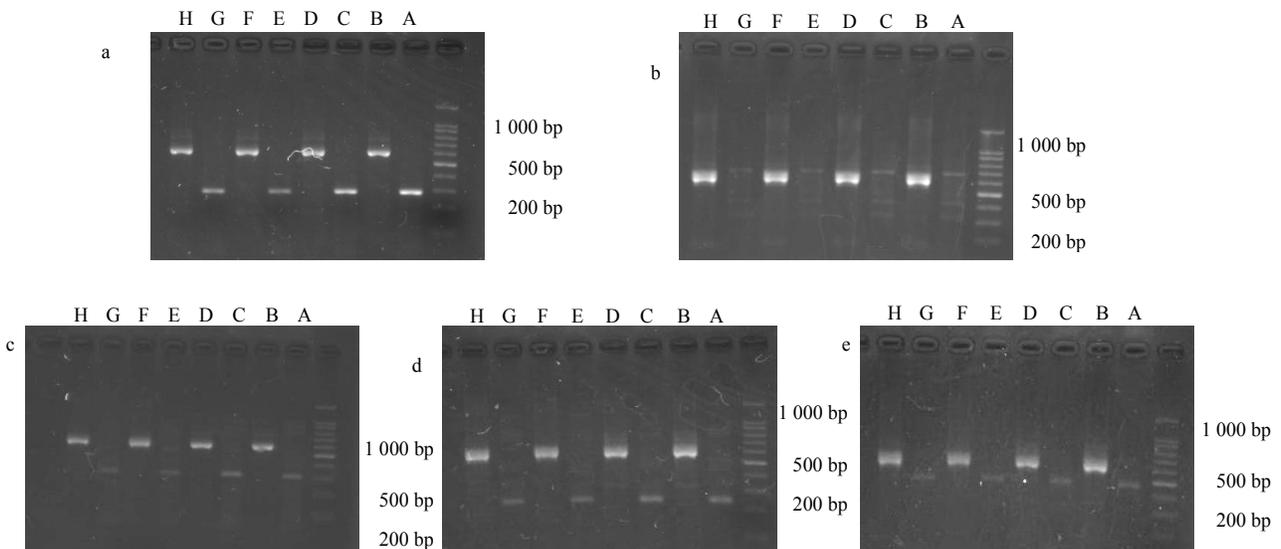
Table 3 Effect of curcumin on Smad3 and Smad7 protein expression of HSC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Smad3	Smad7
对照	—	7.67 ± 0.50	2.37 ± 0.32
姜黄	20	6.36 ± 0.25**	3.66 ± 0.46**
	40	4.70 ± 0.56***	4.92 ± 0.51***
	80	3.32 ± 0.31***	6.63 ± 0.45***

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below

4 讨论

研究表明，在人和其他哺乳动物中只存在有 TGF-β1、2、3，其中 TGF-β1 是目前公认的最强的致肝纤维化细胞因子之一。体内多种细胞如淋巴细胞、巨噬细胞、血小板等均可合成分泌 TGF-β，而



A、B-对照组 C、D-姜黄素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 E、F-姜黄素 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 G、H-姜黄素 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组
A and B-control group C and D-curcumin 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group E and F-curcumin 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group G and H-curcumin 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group

图 1 姜黄素对 HSC 细胞 TGF-β1 (a)、TβRI (b)、TβRII (c)、Col-I (d) 和 Col-III (e) 表达的影响

Fig. 1 Effect of curcumin on expression of TGF-β1 (a), TβRI (b), TβRII (c), Col-I (d), and Col-III (e) in HSC

表 4 姜黄素对 HSC 细胞 TGF-β1、TβRI、TβRII、Col-I、Col-III mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of curcumin on mRNA expression of TGF-β1, TβRI, TβRII, Col-I, and Col-III in HSC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TGF-β1	TβRI	TβRII	Col-I	Col-III
对照	—	0.835 ± 0.007	0.463 ± 0.006	0.557 ± 0.004	0.583 ± 0.005	0.573 ± 0.004
姜黄素	20	0.783 ± 0.004***	0.442 ± 0.005**	0.568 ± 0.002	0.577 ± 0.006	0.568 ± 0.003
	40	0.608 ± 0.002***	0.386 ± 0.005***	0.482 ± 0.004***	0.565 ± 0.007**	0.535 ± 0.004***
	80	0.597 ± 0.005***	0.372 ± 0.007***	0.471 ± 0.003***	0.543 ± 0.003***	0.497 ± 0.007***

在肝脏,它主要由激活的肝库普弗细胞与 HSC 生成。TGF- β 1 在纤维化的起始和持续发展中起关键作用,主要表现在,促进 HSC 活化成肌成纤维细胞,促进基质基因的表达,增加 I、III、IV 胶原量,抑制基质降解和调节细胞周期,抑制肝细胞再生,诱导肝细胞凋亡^[10]。

TGF- β 必须与靶细胞表面高亲和力的受体(T β R)结合后才能发挥生物学效应,人多种细胞表面存在 3 种类型的 T β R (I、II、III),其结构相似,分为膜外区(细胞因子结合区)、跨膜区(疏水氨基酸富有区)和膜内区(信号传导区),I 和 II 型受体跨膜区具有信号转导所必需的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性。Smads 蛋白是 TGF- β 信号转导通路中最重要的胞内效应分子,没有 Smads 复合物生成,TGF- β 无法诱导 HSC 转化及合成分泌胶原和其他 ECM^[11]。依据 Smad 蛋白在 TGF- β 家族中信号传导的作用,可分为 3 类:(1)受体型 Smad (receptor-regulated Smads): Smad2、3,参与 TGF- β 与激活素(activine)的信号转导。(2)共同型 Smad (common mediate Smad): Smad4, TGF- β 信号转导途径的共同通路。(3)抑制型 Smad (inhibitory Smad): Smad6、7,可拮抗受体激活的 Smad 蛋白介导的信号传导,形成控制 TGF- β 反应的负反馈环路。基本的 TGF- β 1/Smad 信号转导系统是: TGF- β 1 信号转导首先是 TGF- β 配体结合到细胞表面的 T β RII,再激活 T β RI 的丝氨酸/苏氨酸激酶区从而活化 T β RI,形成异源三聚体, T β RI 再磷酸化而激活 Smad2、3 蛋白,激活的 Smad2、3 蛋白才能与 Smad4 形成活性的转录复合物进入核内,从而将信号从胞质转导到细胞核,调节目的基因的转录^[12],如与胶原基因启动子结合,促进胶原合成。Smad6、7 是细胞中 T β RI 型受体丝氨酸/苏氨酸激酶的拮抗蛋白,能牢固的与 T β RI 型受体结合,使之无法将 Smad2、3 磷酸化而阻断信号转导过程,抑制型 Smad 在 TGF- β 信号转导中构成负反馈调节环路^[13]。

研究证实,可溶性 T β RII 受体(soluble TGF- β type II receptor, STR)能显著抑制肝纤维化大鼠 III 型胶原 mRNA 的表达,亦能显著抑制 TGF- β 1、T β RII 蛋白和基因的表达,表明 STR 能抑制 TGF- β 和具有抗肝纤维化的作用^[14]。本实验结果发现,HSC 表达 TGF- β 1、T β RI、T β RII mRNA 强烈,I、III 型胶原 mRNA 较强。经姜黄素干预后,HSC 增殖受到抑制,细胞凋亡增加,对 HSC 表达 TGF- β 1、T β RI、

T β RII mRNA 有明显的抑制作用,对基质基因如 I、III 胶原 mRNA 的表达也有明显抑制效果;免疫组化结果显示姜黄素能下调 Smad3 在 HSC 的表达,提高 Smad7 的表达,表明姜黄素能有效抑制 TGF- β 1 及细胞内信号在 HSC 中的表达,阻止其促肝纤维化效应。

参考文献

- [1] Jiao J J, Friedman S L, Costica A. Hepatic fibrosis [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2009, 25(3): 223-229.
- [2] Anand P, Kunnumakkara A B, Newman R A, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(6): 807-818.
- [3] 罗廷顺,李洪文,刘正文,等.姜黄素的提取分离与药理作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(2): 102-107
- [4] 张 姐,金城,骆骄阳,等.姜黄素类化合物体外抗凝血与抗血栓作用研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 2070-2073.
- [5] 狄建彬,顾振纶,赵笑东,等.姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(5): 附 18-附 21.
- [6] 赵珍东.姜黄素抗肝纤维化作用及机理研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(3): 122-125.
- [7] Rajasekaran M, Kasyan A, Jain A, et al. Altered growth factor expression in the aging penis: the Brown-Norway rat model [J]. *J Aandrol*, 2002, 23(3): 393-399.
- [8] Expression of transforming growth factor- β 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis [J]. *AJP*, 2002, 160(5): 1787-1798.
- [9] Hou C C, Wang W S, Huang X R. Ultrasound-microbubble-mediated gene transfer of inducible Smad7 blocks transforming growth factor- β signaling and fibrosis in rat remnant kidney [J]. *AJP*, 2005, 166(3): 761-770.
- [10] Fidler I J. Blockade of the TGF- β superfamily by Smad7: breaking a link in the metastatic chain [J]. *J Nat Cancer Inst*, 2005, 97(23): 1714-1715.
- [11] Long J Y, Wang G N, Matsuura I, et al. Activation of Smad transcriptional activity by protein inhibitor of activated STAT3 (PLAS3) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1): 99-104.
- [12] Bai S, Cao X. A nuclear antagonistic mechanism of inhibitory Smads in transforming growth factor-beta signaling [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(6): 4176-4182.
- [13] Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, et al. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury [J]. *Hepatology*, 2002, 35(1): 49-61.
- [14] Yao H, Pan J, Qian Y, et al. Enhanced effect of soluble transforming growth factor-beta receptor II and IFN-gamma fusion protein in reversing hepatic fibrosis [J]. *Eur J Med Res*, 2010, 15(4): 152-161.