

[文章编号] 1000-4718(2019)01-0168-06

miR-29b 介导的 TGF- β /Smad 信号通路对大鼠 肝纤维化进程的影响*

谭洁, 田霞[△], 韩峥, 朱庆曦, 刘蒙
(武汉大学同仁医院, 武汉市第三医院, 湖北 武汉 430060)

[摘要] **目的:** 初步研究微小 RNA-29b(miR-29b)介导的 TGF- β /Smad 信号通路在肝星状细胞(HSC)活化中的作用及其对大鼠肝纤维化进程的影响。**方法:** 构建肝纤维化大鼠模型并分离其 HSC,同时通过体外获取并鉴定正常大鼠 HSC。运用 RT-qPCR 和 Western blot 检测以上获取细胞中 miR-29b、TGF- β /Smad 信号通路相关蛋白和肝纤维化标志蛋白的变化水平,并通过双萤光素酶报告基因检测系统鉴定 miR-29b 对 TGF- β 1 的直接靶向结合情况。**结果:** 随着 HSC 活化加深,miR-29b 的表达量逐渐减少($P < 0.01$),而 HSC 活性标志物 I 型胶原蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白的表达量逐渐增加($P < 0.01$)。在 TGF- β /Smad 信号通路中,Smad2/3/4 的表达显著增加,而 Smad7 的表达明显下降($P < 0.01$)。双萤光素酶报告基因检测结果显示,miR-29b 可直接结合于 TGF- β 1 3' UTR 的“UCUCUCCGU”序列,表明 TGF- β 1 为 miR-29b 的一个下游靶基因。**结论:** miR-29b 可参与抑制 HSC 的活化和迁移,进而抑制肝纤维化进程,而其生物学功能可能是通过直接靶向抑制 TGF- β 1 进而调控 TGF- β /Smad 信号通路实现的。

[关键词] 微小 RNA-29b; TGF- β /Smad 信号通路; 肝星状细胞; 肝纤维化

[中图分类号] R575.2; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.01.026

Effect of miR-29b-mediated TGF- β /Smad signaling pathway on progression of hepatic fibrosis in rats

TAN Jie, TIAN Xia, HAN Zheng, ZHU Qing-xi, LIU Meng

(Tongren Hospital of Wuhan University, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China. E-mail: 294266051@qq.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the role of microRNA-29b (miR-29b)-mediated TGF- β /Smad signaling pathway in the activation of hepatic stellate cells (HSC) and its effect on the progression of hepatic fibrosis in rats. **METHODS:** Hepatic liver fibrosis rat model was established, and its HSC were isolated. Normal rat HSC were also obtained and identified *in vitro*. RT-qPCR and Western blot were used to detect the alterations of miR-29b, TGF- β /Smad signaling pathway-related proteins and liver fibrosis marker proteins in the acquired cells. Finally, the direct targeting binding of miR-29b to TGF- β 1 was identified by dual-luciferase reporter assay system. **RESULTS:** With the activation of HSC, the expression of miR-29b gradually decreased ($P < 0.01$), while the expression of collagen type I and α -smooth muscle actin gradually increased ($P < 0.01$). At the same time, the expression of Smad2/3/4 was significantly increased, and the expression of Smad7 was significantly decreased ($P < 0.01$). Dual-luciferase reporter assay showed that miR-29b bound directly to "UCUCUCCGU" in the 3' UTR of TGF- β 1, indicating that TGF- β 1 was a downstream target gene of miR-29b. **CONCLUSION:** miR-29b may be involved in the inhibition of HSC activation and migration, thereby inhibiting the process of liver fibrosis. The biological function of miR-29b may be through the direct targeting of TGF- β 1, thus regulating and inhibiting the TGF- β /Smad signaling pathway.

[KEY WORDS] MicroRNA-29b; TGF- β /Smad signaling pathway; Hepatic stellate cells; Hepatic fibrosis

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是存在于肝脏窦周狄氏间隙中的维生素 A 存储细胞。HSC 和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 在肝纤维化发病过程中扮演重要的角色^[1]。多种

[收稿日期] 2017-12-28 [修回日期] 2018-04-24

* [基金项目] 武汉市卫生局项目 (No. WX15D24)

[△]通讯作者 Tel: 027-68894864; E-mail: 294266051@qq.com

因素引起的肝损伤都可能激活 HSC, 而活化的 HSC 可释放多种促进纤维化进程的细胞因子, 进而转变为肌成纤维细胞 (myofibroblast, MFB)^[2-5]。研究表明, TGF- β 对肝纤维化的调控主要是通过 TGF- β /Smad 信号通路实现, 活化的 TGF- β 可激活 TGF- β /Smad 信号通路, 进而促进 HSC 合成胶原和纤维连接蛋白等细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 从而加速肝纤维化的发生。

微小 RNA-29 (microRNA-29, miR-29) 是新近发现的一个与纤维化疾病密切相关的小分子 RNA^[6]。研究表明 miR-29b 在肝纤维化小鼠和进展性肝纤维化患者肝脏组织中的表达明显下降^[7-10], 且可抑制多种胶原蛋白的表达^[11], 这提示 miR-29b 在肝纤维化的进程中发挥了重要作用, 且很可能具有强大的抗纤维化潜能。此外 miR-29 还可通过抑制 TGF- β /smad 信号通路介导上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和致纤维化过程, 在多种器官纤维化中起着重要的作用。

本研究通过检测活化的 HSC 及肝纤维化动物模型获取的 HSC 中 miR-29b、TGF- β /Smad 信号通路相关蛋白和肝纤维化标志蛋白的水平变化, 研究它们与 HSC 活化程度和肝纤维化的关联性, 后通过进一步鉴定 miR-29b 对 TGF- β 1 的直接靶向结合, 探讨肝纤维化过程中 miR-29b 对 TGF- β /Smad 信号通路的调控作用, 为进一步研究抗肝纤维化提供新的思路。

材 料 和 方 法

1 实验动物和主要试剂

14~16 月龄雄性 Wistar 大鼠 12 只, 体重 400~600 g, 购自湖北省医学动物实验中心, 合格证编号为 No. 42000600016665。TRIzol RT RNA (MRC); Eastep RT Master Mix Kit (Promega); SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa), 引物由 TaKaRa 公司设计; 天狼星红试剂盒 (Bioswamp); 抗 I 型胶原 (collagen type I, Col I)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、TGF- β 1、Smad2、Smad3、Smad4 和 Smad7 抗体 (Abcam); 抗 β -actin 抗体 (CST); 羊抗兔 II 抗 (Genetex)。

2 实验仪器

电泳仪及显影仪 (Bio-Rad); 酶标仪 (Thermo); 脱水机、包埋机、切片机和摊片烤片机 (Leica); 正置显微镜 (Nikon); 荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500); 全自动生化分析仪 (PUZS-300X)。

3 方法

3.1 猪血清诱导免疫性大鼠肝纤维化模型的制备及鉴定 无菌条件下制备猪血清, 连续 8 周腹腔注射 (每次 0.5 mL, 每周 2 次) 免疫雄性 Wistar 大鼠以制备大鼠免疫性肝纤维化模型^[12]。8 周后处死大鼠, 分离大鼠肝脏 HSC, 进行体外培养, 并使用全自动生化分析仪将获取的大鼠血清进行肝纤维化相关指标检测。

3.2 HE 染色及天狼星红染色观察胶原纤维 取肝纤维化模型大鼠肝脏用 4% 甲醛固定, 按照组织制片的常规程序进行脱水和包埋, 以 4 μ m 厚度进行连续切片, 将切片用二甲苯脱蜡, 以不同浓度的乙醇进行梯度脱水, 然后伊红染色 (福州迈新生物技术开发有限公司), 苏木素 (福州迈新生物技术开发有限公司) 复染, 梯度脱水, 二甲苯通透, 中性树脂胶封片, 显微镜下观察。同时取脱蜡后的组织切片用天狼星红饱和苦味酸液染色 15~30 min, 苏木素复染, 梯度脱水, 二甲苯通透, 中性树脂胶封片, 显微镜下观察。

3.3 HSC 的分离培养及实验分组 取雄性 Wistar 大鼠, 分离门静脉并插管, 采用酶消化-密度梯度离心法分离 HSC (依次灌注链酶蛋白酶-胶原酶, 37 $^{\circ}$ C 原位消化, 12% Nycodenz 密度梯度离心获得 HSC), 并命名为初始 HSC。所得 HSC 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 中培养, 隔天更换培养液^[13], 体外培养 2 d 的作为静息状态 HSC。取静息状态 HSC 与初始 HSC 进行鉴定, 鉴定成功的继续培养 7 d 作为半活化状态 HSC, 培养 14 d 作为完全活化状态 HSC, 并取构建成功的纤维化大鼠模型体外培养的 HSC 作为纤维化模型细胞, 将细胞分为初始 HSC (HSC-1)、静息状态 HSC (HSC-2)、半活化状态 HSC (HSC-3)、完全活化状态 HSC (HSC-4) 和纤维化模型 HSC (HSC-5), 共 5 组。

3.4 RT-qPCR 检测 miR-29b 及 mRNA 的表达 提取细胞总 RNA (TRIzol 法), 并按照逆转录试剂盒说明书使用一步法进行逆转录合成 cDNA, 然后按照 RT-qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行 PCR 操作。检测 mRNA 的反应体系为: SYBR Premix Ex Taq II (2 \times) 10 μ L; cDNA template 2 μ L; 引物 10 μ mol/L (F/R) 0.3 μ L; RNase-free water 7.4 μ L。检测 miRNA 的反应体系为: 5 \times MMLV RT buffer 4 μ L; dNTP (10 mmol/L) 0.75 μ L; miRNA/U6 snRNA RT Primer Mix (1 μ mol/L) 1.2 μ L; RNasin (40 U/ μ L) 0.5 μ L; MMLV reverse transcriptase (200 U/ μ L) 0.2 μ L; miRNA template 3 μ g; RNase-free water 加至 20 μ L。按照 2 步法 PCR 标准程序扩增, 扩增后 RNA 相对表

定量计算公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 的相关引物序列

Table 1. The primer sequences for RT-qPCR

Name	Primer sequence (5'-3')
miR-29b	F: GGGTAGCACCATTTGAAA
	R: AACTGGTGTCTGGAGTCGGC
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA
	R: AACGCTTCACGAATTTGCG
TGF- β 1	F: GTGACCGCAACAACGCAATCTATG
	R: GGCCTGCTTCCCGAATGTCTGA
Smad2	F: CCAGGTCTCTTGATGGTCGT
	R: ATGATGGCTGTGAAGTCTC
Smad3	F: CAGGGCTTTGAGGCTGTCTA
	R: GGTGCTGGTCACTGTCTGTC
Smad4	F: TGCAGGTGGCTGCTCGGAAAAG
	R: AGGATGATTGGAAATGGGAG
Smad7	F: CTGACAAGGGAAGTGGATGG
	R: GATGGAGAAACCAGGGAACA
α -SMA	F: CTGAAGAGCATCCGACAC
	R: GACTCCATCCCAATGAAAAG
β -actin	F: CTACAATGAGCTGCGTGTGG
	R: AAGGAAGGCTGGAAGAGTG

F: forward; R: reverse.

3.5 Western blot 检测蛋白表达水平 提取各组细胞的总蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(康为世纪公司)测定样品蛋白含量并稀释定量样品,加上样缓冲液煮沸变性后,配制 10% Bio-Rad 蛋白胶,以 20 μ g 总蛋白量上样,电泳后将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,洗膜,分别加 I 抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜,加 II 抗,室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,采用 ECL 化学发光法显色,并使用 Bio-Rad 公司的 ChemiDoc Touch 系统采集图像及数据分析。

3.6 双萤光素酶报告基因检测 依据 GenBank 中 *TGF- β 1* 基因的序列,选取包含与 miR-29b 匹配的一段序列设计引物,然后进行 PCR 扩增,对扩增产物和载体 pmirGLO 进行双酶切,酶切后进行连接,连接产物转化后挑选阳性克隆进行验证。转染前 1 d 将 293T 细胞接种于 24 孔板,质粒转染严格按照 LipofectamineTM 2000 说明书进行,转染 24 h 后, PBS 洗涤细胞,按照 Dual-Luciferase Reporter Assay System 说明书向每个孔中加入 100 μ L PLB,室温摇动 20 min 后加入 20 μ L LAR-II 试剂,放入 GloMax[®] 96 Microplate Luminometer (Promega) 分别读取萤火虫萤光素

酶和海肾萤光素酶催化底物后的发光强度。

4 统计学处理

数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,所有数据均以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。两组间均数比较用 *t* 检验,多组间均数比较采用多因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 纤维化 HSC 的鉴定

对获取的 HSC 进行 RT-qPCR 及 Western blot 检测发现,静息状态 HSC (HSC 组) 中肝纤维化标志蛋白 Col I 和 α -SMA 的 mRNA 表达水平是初始 HSC (control 组) 的 4 倍 ($P < 0.01$),同时蛋白表达水平在 HSC 组是 control 组的 2 倍 ($P < 0.01$),见图 1。肝纤维化标志物 Col I 和 α -SMA 在 mRNA 及蛋白水平的表达均增加,初步判断纤维化 HSC 获取成功。

2 肝纤维化模型大鼠的鉴定

肝纤维化模型大鼠血清肝纤维化指标 III 型前胶原 (procollagen type III, PC III)、IV 型胶原 (collagen type IV, Col IV)、层粘连蛋白 (laminin, LN) 及透明质酸酶 (hyaluronomic acid, HA) 均高于正常大鼠 ($P < 0.01$),见表 2。对 2 组大鼠肝脏石蜡切片进行 HE 染色和天狼星红染色观察发现,正常大鼠肝小叶结构正常,肝细胞排列规则,肝窦与汇管区成纤维细胞少;而纤维化模型组大鼠肝小叶结构紊乱,肝细胞体积增大,有大量炎性细胞浸润,部分肝细胞坏死,纤维组织增生明显,见图 2。病理及血清肝纤维化指标表明,肝纤维化模型大鼠病情发展较为严重,大鼠纤维化模型构建成功。

3 不同活化状态的 HSC 及肝纤维化 HSC 中相关蛋白及 miR-29b 表达的检测

对不同活化状态下的 HSC 及肝纤维化 HSC 进行 RT-qPCR 检测发现,随着 HSC 活化程度的增加,直至转化为肝纤维化 HSC 的过程中,miR-29b 的表达水平逐渐降低 ($P < 0.05$);同时与肝纤维化过程密切相关的 TGF- β 1、Col I、Smad2、Smad3、Smad4 和 α -SMA 的 mRNA 水平随着纤维化程度的加深逐渐增加,而对纤维化有抑制作用的 Smad7 的 mRNA 含量明显减少 ($P < 0.05$),见图 3。进一步通过 Western blot 检测发现, TGF- β 1、Col I、Smad2、Smad3、Smad4 和 α -SMA 的蛋白表达量同样随着 HSC 细胞的活化程度逐渐增加,而 Smad7 蛋白的含量逐渐减少 ($P < 0.05$),见图 4。

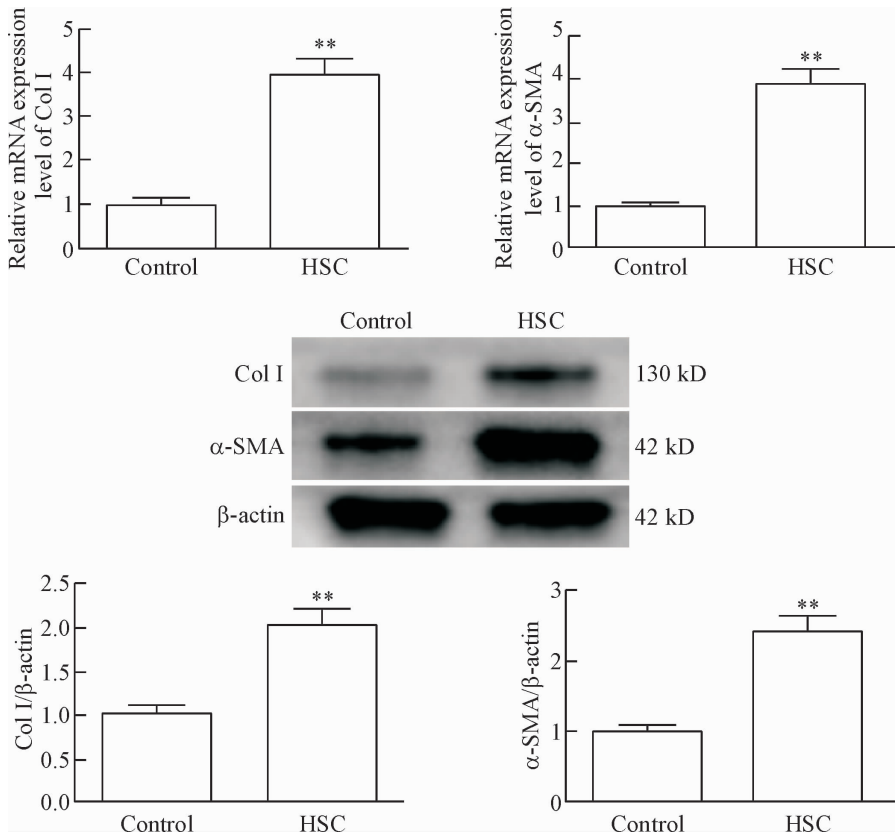


Figure 1. The mRNA and protein expression of fibrosis-related genes in hepatic fibrosis rat HSC cultured *in vitro*. Mean \pm SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs control group.

图 1 体外获取的纤维化 HSC 相关 mRNA 及蛋白表达水平的变化

表 2 大鼠血清纤维化指标的比较

Table 2. The serum fibrosis indicators in the rats ($\mu\text{g/L}$. Mean \pm SD. $n = 3$)

Group	HA	LN	PC III	Col IV
Normal	89.28 \pm 18.93	124.91 \pm 25.76	17.83 \pm 4.85	73.27 \pm 24.90
Model	218.03 \pm 71.05 **	296.85 \pm 63.01 **	99.04 \pm 27.59 **	179.48 \pm 48.05 **

** $P < 0.01$ vs normal group.

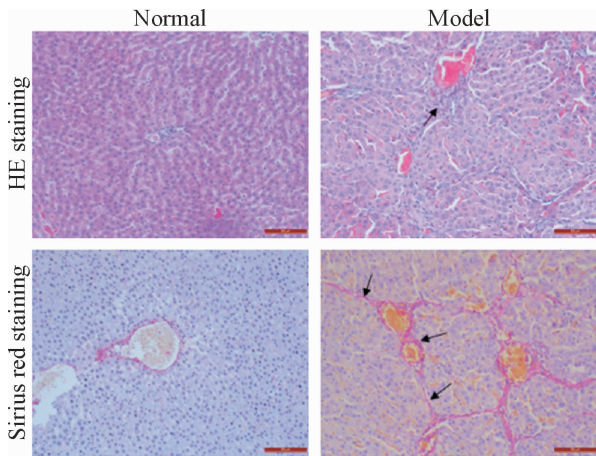


Figure 2. The pathological observation of the rat liver with HE and Sirius red staining ($\times 200$).

图 2 HE 及天狼星红染色大鼠肝脏病理切片的观察

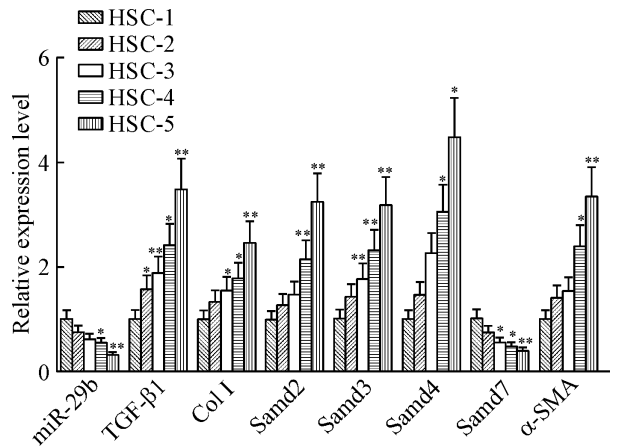


Figure 3. The expression of miR-296 and the mRNA expression of fibrosis-related genes in liver fibrosis process. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HSC-1 group.

图 3 纤维化过程中 miR-296 及与纤维化密切相关的 mRNA 表达水平的变化

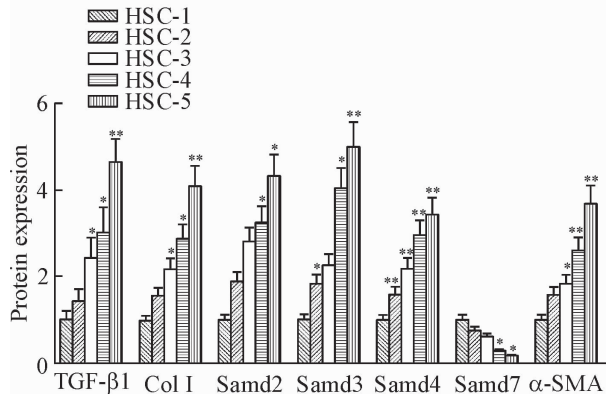
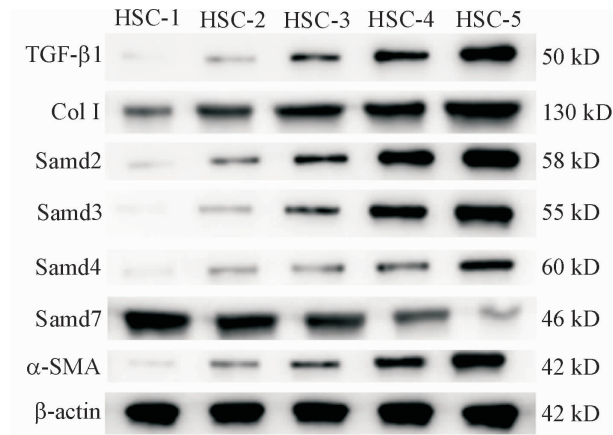


Figure 4. The protein expression of fibrosis-related genes in liver fibrosis process. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HSC-1 group.

图4 纤维化过程中与纤维化密切相关的蛋白表达水平的变化

4 双荧光素酶靶点预测

运用 TaragetScan 预测发现 *TGF-β1* 为 miR-29b 的下游靶基因之一, miR-29b 与 *TGF-β1* mRNA 的 3'-UTR 互补序列见图 5A。双荧光素酶报告系统验证结果显示,在野生型(WT)组中 miR-29b mimic 与 *TGF-β1* 结合后的荧光强度明显低于对照(NC)组,差异具有统计学意义($P < 0.01$);而在 Mut 组中 miR-29b 组与 NC 组间的差异并没有统计学显著性,见图 5B。以上结果证实 miR-29b 可直接靶向于 *TGF-β1* 的 3'-UTR。

讨 论

肝纤维化是各种慢性肝病发展的中心环节^[14],近年来的研究发现 HSC 持续活化所导致的细胞外基质过度沉积是肝纤维发生、发展的关键因素。正常状况下,HSC 处于静止状态,当肝脏受到外界刺激时 HSC 会被激活并持续增殖,导致细胞外基质合成与降解失衡,最终形成肝纤维化^[15]。

TGF-β 在肝纤维化的发生过程中具有重要的作用,其作为一种关键的促纤维化因子,可增强 ECM

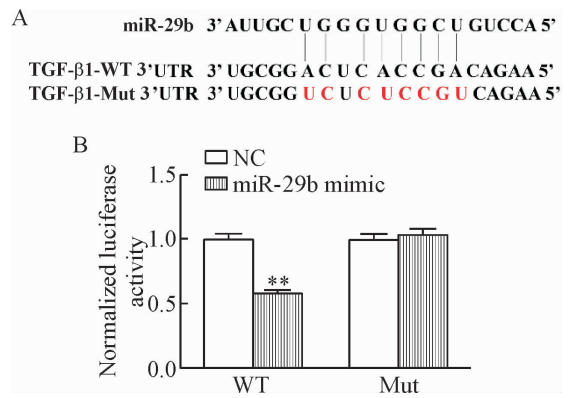


Figure 5. Direct targeted binding of miR-29b to *TGF-β1*. A: prediction of the binding sites; B: relative luciferase activity. Mean \pm SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs NC group.

图5 miR-29b 与 *TGF-β1* 的直接靶向结合

的表达,而 I 型胶原蛋白和 α -平滑肌动蛋白等是构成 ECM 的重要组成部分,通常作为肝星状细胞活化的标记物^[16-17]。Smad4 作为 *TGF-β*/Smad 信号通路的重要下游分子,*TGF-β* 受体二聚化后会激活 Smad2/Smad3,进而使其形成复合物,随后 Smad2/Smad3 复合物与 Smad4 结合并进入细胞核,最后与特异的 DNA 连接蛋白结合,从而促进 *TGF-β* 的表达^[18-19]形成稳定的异源多聚体,转入核内与各种转录因子相结合,进而启动纤维化相关基因的表达^[20];而 Smad7 能通过活化的 *TGF-β1* 结合从而抑制该信号通路的激活^[21],进而抑制纤维化的进程。

本研究通过体外获取 HSC 及肝纤维化 HSC,检测不同活化程度的 HSC 及肝纤维化 HSC 的 miR-29b 及相关蛋白的表达。结果表明,随着 HSC 活化程度的加深,miR-29b 的表达量逐渐减少。且在 HSC 活化直至纤维化进程中,*TGF-β*/Smad 信号通路中 Smad2/3/4 的表达逐渐增加,而 Smad7 的表达则随之下降。后通过双荧光素酶系统对 miR-29b 的靶位点进行初步验证,可发现 *TGF-β1* 为 miR-29b 的直接下游靶点。由此可判断 miR-29b 可能通过抑制 *TGF-β1* 进而调控 *TGF-β*/Smad 信号通路,最终抑制 HSC 的增殖和活化引起的肝纤维化。

综上所述,本研究证实在肝纤维化发展过程中,miR-29b 随着 HSC 的活化逐渐降低,且其可能是通过调控 *TGF-β*/Smad 信号通路发挥其作用的。这初步揭示了 miR-29b 及 *TGF-β*/Smad 信号通路在肝纤维化发展中的作用,并为肝硬化的治疗提供了新的治疗靶点。

[参 考 文 献]

[1] Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and *TGF-β* as

- major players and therapeutic targets [J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1):76-99.
- [2] Urtasun R, Nieto N. Hepatic stellate cells and oxidative stress[J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2007, 99(4):223-230.
- [3] Muriel P, Fernandez-Martinez E, Perez-Alvarez V, et al. Thalidomide ameliorates carbon tetrachloride induced cirrhosis in the rat[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 15(9):951-957.
- [4] Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. *Gut*, 2005, 54(1):142-151.
- [5] 李静, 王维, 沈继龙. TGF- β 与 IL-13 在血吸虫病肝纤维化细胞信号转导中的作用[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2009, 27(4):357-360.
- [6] Bai X, Tang Y, Yu M, et al. Downregulation of blood serum microRNA 29 family in patients with Parkinson's disease[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):5411.
- [7] Maurer B, Stanczyk J, Jungel A, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(6):1733-1743.
- [8] Dong XR, Majesky MW. Restoring elastin with microRNA-29[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(3):548-551.
- [9] Suarez Y, Fernandez-Hernando C. New insights into microRNA-29 regulation: a new key player in cardiovascular disease[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(3):584-586.
- [10] Villarreal GJ, Oh DJ, Kang MH, et al. Coordinated regulation of extracellular matrix synthesis by the microRNA-29 family in the trabecular meshwork[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6):3391-3397.
- [11] Peng WJ, Tao JH, Mei B, et al. MicroRNA-29: a potential therapeutic target for systemic sclerosis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(9):875-879.
- [12] 陈金锋, 高家荣, 姜辉, 等. 肝纤维化动物模型研究进展[J]. *安徽中医药大学学报*, 2012, 31(6):83-86.
- [13] 刘婷婷, 胡江峰, 齐峰, 等. 小鼠肝星状细胞分离方法的优化[J]. *海南医学院学报*, 2014, 20(10):1320-1322.
- [14] 侯洪伟, 潘崢, 陈敏, 等. 四氯化碳诱导兔肝纤维化模型的改良[J]. *东南大学学报: 医学版*, 2015, 34(4):562-567.
- [15] Ooi LL. 3rd Yahya Cohen Lecture: the role of the myofibroblast-like cell in hepatocellular carcinoma: host defence? [J]. *Ann Acad Med Singapore*, 1999, 28(3):342-346.
- [16] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, 85(3):367-370.
- [17] Haim A, Albin-Brooks C, Sherer M, et al. The effects of gestational stress and selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant treatment on structural plasticity in the postpartum brain: a translational model for postpartum depression[J]. *Horm Behav*, 2016, 77:124-131.
- [18] Liu C, Gaca MD, Swenson ES, et al. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor- β (TGF- β) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF- β -independent [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(13):11721-11728.
- [19] 陈峰, 郑敏, 陈智. Smad2 和 Smad3 在 TGF- β 信号转导中的作用[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2006, 33(3):187-189.
- [20] 赵辉平, 田卫斌, 刘明义, 等. 肝卵圆细胞对肝纤维化大鼠肝组织 TGF- β /Smad 信号通路的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(7):1335-1340.
- [21] 段文娟, 余学清, 窦献蕊, 等. 上调表达 Smad7 显著抑制 TGF- β 介导的大鼠腹膜间皮细胞 Smad2 的表达 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(10):1873-1878.

(责任编辑: 陈妙玲, 罗森)