

二苯乙烯苷对 TGF- β 1 诱导新生大鼠心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的影响及其机制

曾 翼, 赵 诚, 王 霏, 朱秋燕, 许晓乐*

(南通大学药学院药理学教研室, 南通 226001)

摘 要 探讨二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D 葡萄糖苷, TSG)对转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 诱导的新生大鼠心肌成纤维细胞(CFB)增殖和胶原合成的影响, 并研究其相关机制。用消化法培养新生 SD 大鼠 CFB, 建立 TGF- β 1 诱导新生大鼠 CFB 纤维化模型。采用 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)掺入法检测 CFB 增殖情况; 乳酸脱氢酶(LDH)法检测药物对细胞毒性作用; 羟脯氨酸测定检测 CFB 胶原含量; 流式细胞仪测定细胞周期; Western blot 法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、增殖细胞核抗原(PCNA)、I 型胶原(COL I)、III 型胶原(COL III)、p-Smad2、Smad2、p-Smad3、Smad3、p-ERK、ERK、p-P38、P38、p-JNK、JNK 的蛋白表达。结果表明, 终浓度为 0.1~100 μ mol/L 的 TSG 无明显细胞毒性作用; 在一定浓度范围内, TSG 可明显抑制 TGF- β 1 诱导的 CFB 增殖和胶原合成, 抑制细胞由 G_0/G_1 期向 S 期的转变, 抑制 TGF- β 1 诱导的 CFB 核内 PCNA 的蛋白表达, 降低 α -SMA、COL I 和 COL III 的过度表达, 并抑制 TGF- β 1 诱导的 Smad3、ERK 和 P38 的磷酸化。因此推测一定浓度的 TSG 能抑制 TGF- β 1 诱导的 CFB 增殖和胶原合成, 其机制可能与干预 Smad3、ERK 和 P38 信号通路有关。

关键词 二苯乙烯苷; 心肌成纤维细胞; 增殖; 胶原合成; 转化生长因子 β 1

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)03-0362-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140320

Effects and mechanisms of stilbene glucoside on the proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts stimulated by TGF- β 1

ZENG Yi, ZHAO Cheng, WANG Fei, ZHU Qiuyan, XU Xiaole*

Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Nantong University, Nantong 226001, China

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of stilbene glucoside (2,3,4',5-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D glucoside, TSG) on the cell proliferation and collagen synthesis in cultured neonatal rat cardiac fibroblasts (CFBs) stimulated by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and to explore the underlying mechanisms. CFB were cultured from neonatal rats of 1-3 days and treated with TGF- β 1. CFB proliferation was analyzed by 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation assay. The synthesis of collagen was examined by measurement of the hydroxyproline concentration. Flow cytometry used to examined cell cycle of CFBs treated with TSG. The expressions of α -smooth muscle actin, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), collagen I, collagen III, p-Smad2, Smad2, p-Smad3, Smad3, p-ERK, ERK, p-P38, P38, p-JNK, JNK were measured by Western blot. The results of the present study showed that TSG (0.1-100 μ mol/L) to exerted no significant cytotoxicity on the cells. Within a concentration coverage, TSG inhibited CFB proliferation and collagen synthesis with inhibition of cell cycle transition from G_0/G_1 phase to S phase. Furthermore, TSG decreased the protein expressions of PCNA, α -smooth muscle actin, collagen I, Collagen III, p-Smad3, p-ERK and p-P38 stimulated by TGF- β 1. Taken together, TSG significantly inhibited CFB proliferation and collagen synthesis stimulated by TGF- β 1, though, at least in part, by suppression of Smad3, ERK and P38 activation.

Key words stilbene glucoside; cardiac fibroblasts; proliferation; collagen synthesis; transforming growth factor- β 1

* 收稿日期 2013-12-30 * 通信作者 Tel:15962926909 E-mail:xiaolexu@ntu.edu.cn

基金项目 南通市科技计划资助项目 (No. BK2012013); 南通大学研究生科技创新计划资助项目 (No. YKC12023, YKC13065)

The study was supported by the Nantong Science and Technology Project (No. BK2012013); the Postgraduate Science and Technology Innovation Project of Nantong University (No. YKC12023, YKC13065)

心肌纤维化是多种急慢性心血管疾病共同的病理过程。心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFB)过度增殖、转分化为肌成纤维细胞导致胶原合成分泌过多是心肌纤维化的重要病理基础^[1]。在心肌纤维化的发生机制中转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是主要的调控因子,并通过一系列的级联反应,对细胞的增殖和分化、胶原纤维的合成产生影响^[2]。2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷(简称二苯乙烯苷,2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- β -D-glucoside, TSG)是何首乌的主要药效成分,已被证实对心血管系统有一系列有效作用,如:二苯乙烯苷能降低血脂^[3]、抑制动脉粥样硬化进程^[4]、修复血管内皮^[5]、抑制血管平滑肌细胞增殖及内膜增生^[6-7]、对心肌细胞具有保护作用^[8]。但二苯乙烯苷对心肌纤维化作用尚在进一步探讨中。本研究首次建立TGF- β 1诱导大鼠CFB纤维化模型,观察不同剂量二苯乙烯苷对TGF- β 1诱导大鼠CFB增殖和胶原代谢的影响,研究二苯乙烯苷在抗心肌纤维化的作用和机制,以期探讨其对心肌纤维化的防治途径。

1 材料

1.1 药品及试剂

二苯乙烯苷(中国药品生物制品检定所,110844-200607);人重组TGF- β 1(美国Peprotech公司);胎牛血清(美国Hyclone公司);5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)细胞增殖ELISA试剂(瑞士Roche公司);羟脯氨酸检测试剂盒(南京建成生物公司);增殖细胞核抗原(PCNA)小鼠单抗、细胞外调节蛋白激酶(ERK)兔多抗、p-ERK兔多抗、p-P38兔单抗、P38兔单抗、p-JNK兔单抗和JNK兔单抗(美国CST公司); α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)小鼠单抗(武汉博士德生物工程有限公司);I型胶原蛋白(COL I),III型胶原蛋白(COL III)兔单抗(美国Proteintech公司);p-Smad2兔多抗、Smad2鼠单抗、p-Smad3兔多抗和Smad3兔多抗(南京巴傲得科技公司);内参 β -actin鼠单抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);GAPDH鼠单抗(上海康成

生物有限公司);驴抗鼠、驴抗兔二抗均购自美国Odessey公司。

1.2 仪器

PowerWave340酶标仪(美国Bio-Tek公司);DMI300B荧光倒置相差显微镜(德国Leica公司);电泳及转印装置(美国Bio-Rad公司);FACSCa流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司);红外双色激光成像系统扫描仪(美国Odessey公司)。

1.3 动物

出生1~3 d的SD大鼠,雌雄不限,由南通大学动物实验中心提供,许可证号:SYXK9(苏)200220022。

2 方法

2.1 细胞培养

无菌取出大鼠心室,剪碎,0.25%胰酶在37℃下分散细胞,每隔8分钟收集1次细胞,1 100 r/min离心5 min,离心2次,将所得全部细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,置37℃、5%CO₂培养箱内培养60~90 min。根据CFB较心肌细胞贴壁速度快的原理,采用差速贴壁法,倾去上清液,剩下的细胞即为CFB,DMEM培养液继续培养。经倒置显微镜、免疫组化波形蛋白染色阳性和平滑肌肌动蛋白染色阴性鉴定为所需的CFB,纯度达98%。生长近融合时按1:3传代,实验采用第3代CFB。

2.2 BrdU ELISA法检测细胞增殖活性

BrdU掺入法通过测定新合成的DNA直接反映细胞增殖情况。取对数生长期的CFB,将细胞悬液以每孔100 μ L,按每毫升 2×10^7 个细胞的密度接种于96孔培养板,37℃培养24 h。更换无血清培养液培养24 h使其同步化,再将细胞分为空白对照组、TGF- β 1(5 μ g/L)刺激组和TGF- β 1(5 μ g/L)+不同浓度(0.1,1,10,100 μ mol/L)的二苯乙烯苷干预组。二苯乙烯苷干预组为二苯乙烯苷预先处理1 h后加入TGF- β 1刺激。TGF- β 1刺激20 h,在每孔中加入终浓度10 μ mol/L BrdU继续孵育4 h后终止培养,加入FixDenat使DNA变性,然后每孔加入过氧化物酶POD标记的抗BrdU

抗体孵育 1 h,用洗涤液洗 3 次,每孔加入底物显色液,使 BrdU 掺入的细胞显色,置酶标仪于 370 nm 处检测各孔吸收度(*A*)。

2.3 药物对细胞毒性测定

用培养液中乳酸脱氢酶(LDH)释放量为指标,判断 CFB 损伤程度,即可反映药物对 CFB 的细胞毒性作用。实验分组处理同上,二苯乙烯苷预处理 1 h 后 TGF-β1 刺激 24 h,按照试剂盒说明书的操作步骤测定 LDH 释放率。

2.4 羟脯氨酸法检测胶原蛋白含量

实验分组处理同上,换用 24 孔培养板,二苯乙烯苷预处理 1 h 后 TGF-β1 刺激 24 h,按照羟脯氨酸检测试剂盒的说明书操作。

2.5 细胞周期测定

取对数生长期 CFB,按每毫升 1×10^8 个细胞的密度接种于 50 mL 培养瓶。24 h 贴壁后,更换无血清培养液培养 24 h 使其同步化,再按空白对照组、TGF-β1 刺激组及 100 μmol/L 二苯乙烯苷干预组继续孵育 24 h。收集细胞,用体积分数为 0.7 的乙醇-20 ℃ 固定过夜。固定后的细胞离心,弃上清液,加入碘化丙啶(PI,终浓度为 100 mg/L)和 RNase (终浓度为 100 mg/L),4 ℃ 避光染色 30 min 后,用流式细胞仪检测细胞周期分布。

2.6 Western blot 检测

TGF-β1 刺激 24 h 后离心收集细胞,进行 α-SMA、PCNA、COL I 和 COL III 检测;TGF-β1 刺激

1 h 后离心收集细胞,进行 Smad2、Smad3、ERK、P38 和 JNK 总蛋白及蛋白磷酸化表达的检测。PBS 洗涤 3 次,细胞裂解液在冰上裂解细胞,低温离心 15 min 提取蛋白。加上样缓冲液,100 ℃ 变性 5 min。每孔 50 μg 蛋白上样,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,加入对应一抗稀释液,4 ℃ 过夜,TBST 洗膜,加入相应二抗(1:5 000 稀释),室温孵育 2 h 后显影。

2.7 数据统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析方法进行分析,组间比较用 Student-Newman-Keuls 检验。

3 结 果

3.1 二苯乙烯苷对 TGF-β1 诱导 CFB 增殖和胶原蛋白含量的影响

表 1 显示,与空白对照组比较,TGF-β1 能够显著诱导 CFB 增殖,DNA 合成显著增加($P < 0.01$)。二苯乙烯苷在终浓度 10、100 μmol/L 时,对 TGF-β1 刺激的 CFB 增殖有明显的抑制作用($P < 0.01$)。各组上清液中 LDH 释放率无显著性差异,提示该浓度范围内二苯乙烯苷对 CFB 无毒性作用。这些现象说明二苯乙烯苷抗增殖活性与细胞毒性或损伤无关。10、100 μmol/L 的二苯乙烯苷对 TGF-β1 诱导的 CFB 胶原合成增加均有明显抑制作用($P < 0.01$)。

Table 1 Effects of TSG on the proliferation and collagen synthesis of CFB stimulated by 5 μg/L TGF-β1 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	<i>c</i> /(μmol/L)	<i>A</i>	LDH release/(% of cell lysate)	Collagen/(mg/g)
Control	—	0.305 ± 0.030 1	10.529 ± 2.031	0.520 ± 0.092 4
TGF-β1	—	0.671 ± 0.044 1 * *	10.791 ± 1.808	0.864 ± 0.134 * *
TGF-β1 + TSG	100	0.404 ± 0.039 0 ##	10.966 ± 2.116	0.632 ± 0.102 ##
	10	0.513 ± 0.057 1 ##	9.861 ± 2.064	0.640 ± 0.118 ##
	1	0.619 ± 0.053 8	11.377 ± 2.102	0.775 ± 0.081 8
	0.1	0.657 ± 0.044 9	10.413 ± 1.207	0.813 ± 0.113

TSG:2,3,4',5-tetrahydroxystilbene-2-*O*-β-D glucoside;CFB;cardiac fibroblasts;TGF-β1:transforming growth factor-β1;LDH;lactate dehydrogenase
* * $P < 0.01$ vs control group;## $P < 0.01$ vs TGF-β1 group

3.2 二苯乙烯苷对细胞周期的影响

如图 1 所示,TGF-β1 诱导静止期 CFB 进入增殖期,表现为 G_0/G_1 期比例减少($P < 0.05$),S 期比例增高($P < 0.05$);与 TGF-β1 组相比,100 μmol/L 二苯乙烯苷有效阻止 CFB 进入 S 期,使滞留在 G_0/G_1 期的细胞比例增高($P < 0.05$)。

3.3 二苯乙烯苷对 PCNA、α-SMA、COL I 和 COL III 表达的影响

Western blot 测定显示 TGF-β1 刺激后,PCNA、α-SMA、COL I 和 COL III 蛋白表达明显升高($P < 0.05$);10、100 μmol/L 浓度的二苯乙烯苷能显著抑制 TGF-β1 诱导的 PCNA、α-SMA、COL I 和 COL

Ⅲ蛋白表达($P < 0.05$),结果见图 2。

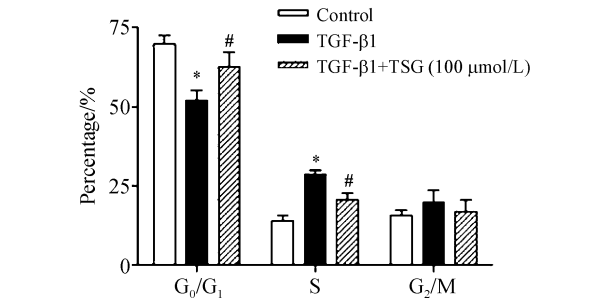


Figure 1 Effect of TSG on cell cycle progression of CFB ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs TGF-β1 group

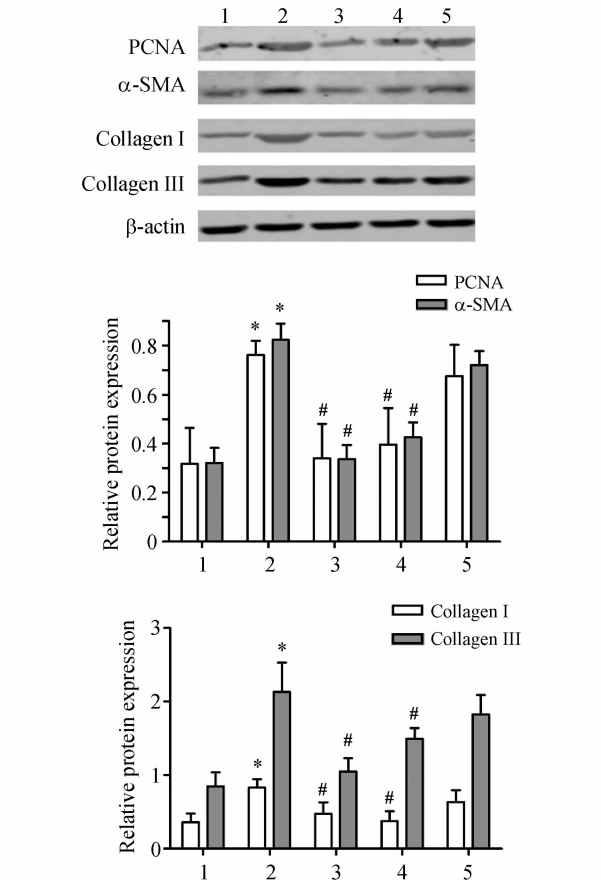


Figure 2 Effect of TSG on PCNA, α-SMA, collagen I and collagen III protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
1: Control; 2: TGF-β1; 3: TGF-β1 + TSG (100 μmol/L); 4: TGF-β1 + TSG (10 μmol/L); 5: TGF-β1 + TSG (1 μmol/L)
PCNA: proliferating cell nuclear antigen; α-SMA: α-smooth muscle actin
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs TGF-β1 group

3.4 二苯乙烯苷对 TGF-β/Smad 信号通路相关蛋白的影响

Western blot 测定显示 TGF-β1 刺激后, p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白表达显著增加($P < 0.05$)。10, 100 μmol/L 二苯乙烯苷能显著抑制 TGF-β1 诱

导的 p-Smad3 表达($P < 0.05$)。各个浓度二苯乙烯苷对 TGF-β1 诱导的 Smad2 磷酸化表达无影响($P > 0.05$),结果见图 3。

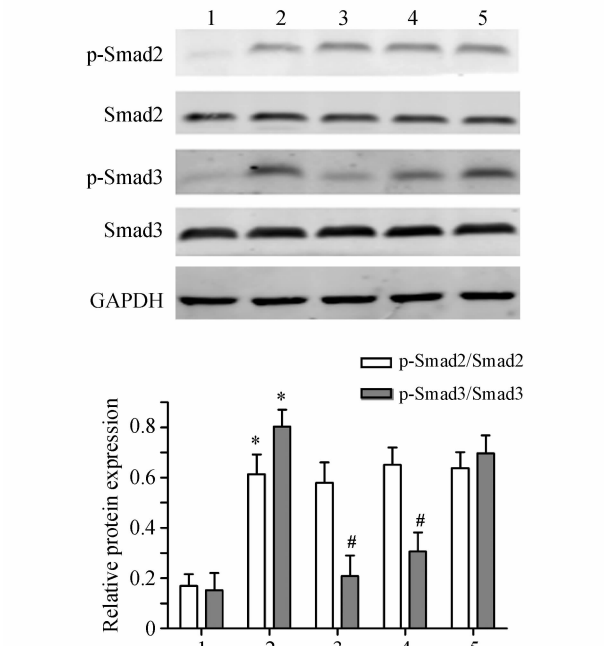


Figure 3 Effect of TSG on TGF-β/Smad signaling pathways ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
1: Control; 2: TGF-β1; 3: TGF-β1 + TSG (100 μmol/L); 4: TGF-β1 + TSG (10 μmol/L); 5: TGF-β1 + TSG (1 μmol/L)
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs TGF-β1 group

3.5 二苯乙烯苷对 TGF-β/MAPKs 信号通路相关蛋白表达的影响

Western blot 测定显示 TGF-β1 刺激后, p-ERK、p-P38 和 p-JNK 蛋白表达显著增加($P < 0.05$)。10, 100 μmol/L 二苯乙烯苷能显著抑制 TGF-β1 诱导的 p-ERK 和 p-P38 表达($P < 0.05$)。各个浓度二苯乙烯苷对 TGF-β1 诱导的 p-JNK 磷酸化表达无影响($P > 0.05$),结果见图 4。

4 讨论

CFB 是心脏中数量最多的间质细胞, 占心脏非心肌细胞的 90% ~ 95%, 对心肌细胞具有结构上的支持, 保护作用。在心肌受损后结构代偿中, CFB 通过增殖和分泌胶原, 参与组织修复和增强抗张力强度, 但进行性发展的心肌纤维化将降低心肌顺应性, 导致心脏功能障碍和心衰^[9]。能有效抑制 CFB 增殖及胶原分泌的药物将可能有效地阻断此环节的发生, 从而延缓或阻滞心肌纤维化的发生发展。

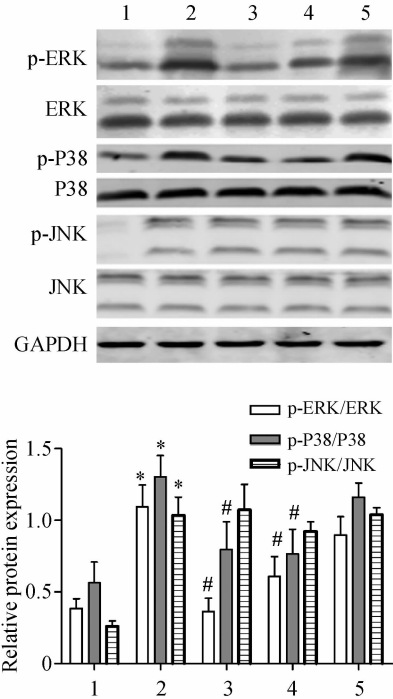


Figure 4 Effect of TSG on TGF-β/ MAPKs signaling pathways ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
1: Control; 2: TGF-β1; 3: TGF-β1 + TSG (100 μmol/L); 4: TGF-β1 + TSG (10 μmol/L); 5: TGF-β1 + TSG (1 μmol/L)
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs TGF-β1 group

作为细胞外间质的重要调节因子,TGF-β1 能通过旁分泌和自分泌形式刺激 CFB 增生、表型的转变,促进细胞外基质的沉积,抑制胶原酶降解,许多促纤维化因子均通过其起作用,还通过信号转导途径作用于其他细胞因子,形成细胞因子网络,发挥更大的效应。TGF-β1 过度表达在纤维化机制中起关键作用,从而也多作为治疗纤维化病变的靶目标^[10]。本实验结果显示,在细胞增殖方面,TGF-β1 可以明显刺激细胞增殖,DNA 合成增加,明显增加 CFB 的 S 期百分率,降低 G₀/G₁ 的百分率,细胞周期蛋白 PCNA 表达增强。在胶原合成方面,TGF-β1 可明显地增加肌成纤维细胞标志性蛋白 α-SMA 表达,使成纤维细胞转化成肌成纤维细胞;TGF-β1 还能刺激成纤维细胞胶原合成,并使肌细胞外间质主要成分是 I、Ⅲ型胶原表达增强,提示发生表型转变的成纤维细胞能合成和分泌大量胶原等细胞外基质(EMC)成分。这些结果进一步证实了 TGF-β1 的促心肌纤维化作用。10,100 μmol/L 二苯乙烯苷能明显抑制 TGF-β1 诱导的 CFB 增殖,阻滞细胞周期,降低其表型转化及胶原分泌,提示

二苯乙烯苷具有潜在的抗心肌纤维化作用。

TGF-β1 信号转导通路包括 Smad 及非 Smad 信号通路两类。大量研究证实,TGF-β1/Smads 信号转导通路是 TGF-β1/发挥生物学作用的主要通路。TGF-β1 与其 I、Ⅱ型受体结合后,活化的受体使胞浆内相应的 Smad 发生磷酸化而被激活。Smad2 和 Smad3 是 TGF-β1 I 型受体胞内激酶的特异性底物,正常情况下主要位于细胞浆内,Smad2 和 Smad3 依次被磷酸化后与 Smad4 结合转位至细胞核内,参与调控靶基因的转录。被激活的 Smad2 和 Smad3 介导的 TGF-β 信号可诱导成纤维细胞增殖、分化为肌成纤维细胞,肌成纤维细胞能产生大量基质蛋白成分并分泌到细胞外基质中,如 α-SMA、胶原蛋白等 EMC 组分在 TGF-β 的刺激下合成增多并促使他们在 EMC 沉积,可以增强肌成纤维细胞的转化、胶原的过度合成,进一步加速心肌纤维化的发展。因此,Smad2 和 Smad3 蛋白的磷酸化与核转位在 TGF-β1 信号转导中起关键性作用。抑制其磷酸化可干扰其核转位,从而抑制 TGF-β1 的信号转导^[11-12]。本实验结果显示,二苯乙烯苷可以抑制 TGF-β1 诱导的 p-Smad3 表达,对 p-Smad2 表达无影响,表明 TGF-β1/Smad3 信号通路的活化参与了二苯乙烯苷调控心肌纤维化过程。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated proteinkinase, MAPKs)是细胞膜信号向核信号传递的枢纽,是 TGF-β1 非 Smad 信号通路中最重要信号通路之^[13-14]。MAPKs 主要包括细胞外信号调节激酶 ERK1/2、JNK、P38 MAPK,调节着细胞的生长、分化、发育以及凋亡等一系列行为和功能^[15]。MAPKs 可被多种细胞因子激活,如血小板衍生生长因子、白细胞介素-1、肿瘤坏死因子-A 等。文献报道在多种不同的细胞类型中 TGF-β1 能够直接激活 MAPKs 信号系统中的这 3 条信号通路^[14]。本研究可观察到,TGF-β1 刺激 CFB 组 ERK1/2、JNK、P38 MAPK 磷酸化表达较对照组明显增加;与 TGF-β1 刺激组比较,二苯乙烯苷组明显降低了 p-ERK 和 p-P38 的表达,而对 p-JNK 无作用。提示,ERK1/2、JNK、P38 MAPK 信号途径参与了 TGF-β1 刺激成纤维细胞增殖、分化及胶原合成的过程,并且二苯乙烯苷可能通过抑制 ERK1/2 和 P38 蛋白磷酸化这一环节来发挥作用。

综上所述,二苯乙烯苷能抑制 TGF-β1 诱导的

CFB增殖和胶原合成,其机制可能与干预Smad3、ERK和P38信号通路有关。这些研究结果为二苯乙烯苷抗心肌纤维化的机制提供了新的线索,为二苯乙烯苷的开发研究提供切实可靠的实验依据。

参考文献

- [1] Vasquez C, Benamer N, Morley GE. The cardiac fibroblast: functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011, **57**(4): 380 – 388.
- [2] Lim H, Zhu YZ. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, **63**(22): 2584 – 2596.
- [3] Zhang W, Wang CH, Li F, et al. 2,3,4',5-Tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside suppresses matrix metalloproteinase expression and inflammation in atherosclerotic rats[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008, **35**(3): 310 – 316.
- [4] Cui HH, Tian Y, Long SY. The effective mechanism of 2,3,5, '4-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside in anti-atherosclerosis [J]. *Prog Mod Biomed* (现代生物医学进展), 2009, **9**(20): 3968 – 3971.
- [5] Zhang W, Xu XL, Wang YQ, et al. Effects of 2,3,4',5-tetrahydroxystilbene 2-O-beta-D-glucoside on vascular endothelial dysfunction in atherogenic-diet rats [J]. *Planta Med*, 2009, **75**(11): 1209 – 1214.
- [6] Xu XL, Ling DY, Zhu QY, et al. The effect of 2,3,4',5-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D glucoside on neointima formation in a rat artery balloon injury model and its possible mechanisms[J]. *Eur J Pharmacol* 2013, **698**(1/2/3): 370 – 378.
- [7] Xu XL, Zhang W, Huang YJ, et al. Effect of 2,3,4',5-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D glucoside on vascular smooth muscle cells proliferation [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2010, **26**(7): 421 – 426.
- [8] Zhang SH, Wang WQ, Wang JL. Protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside on cardiotoxicity induced by doxorubicin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2009, **30**(11): 1479 – 1487.
- [9] Lajiness JD, Conway SJ. The dynamic role of cardiac fibroblasts in development and disease [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2012, **5**(6): 739 – 748.
- [10] Edgley AJ, Krum H, Kelly DJ. Targeting fibrosis for the treatment of heart failure: a role for transforming growth factor- β [J]. *Cardiovasc Ther*, 2012, **30**(1): e30 – e40.
- [11] Gaudie J, Bonniaud P, Sime P, et al. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis [J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, **35**(Pt 4): 661 – 664.
- [12] Lan H Y, Chung AC. Transforming growth factor- β and Smads [J]. *Contrib Nephrol*, 2011, **170**: 75 – 82.
- [13] Mu Y, Gudey SK, Landstrom M. Non-Smad signaling pathways [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, **347**(1): 11 – 20.
- [14] Gui T, Sun Y, Shimokado A, et al. The roles of mitogen-activated protein kinase pathways in TGF- β -Induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Signal Transduct*. doi: 10.1155/2012/289243.
- [15] Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases [J]. *Circulation*, 2007, **116**(12): 1413 – 1423.