

# MAPK 抑制因子对 HSC 中 Smad2/3 磷酸化及 Smad4 核转位的影响

江宇峰, 伍超, 吴佳俊, 王极宇, 马成骁, 陈帆, 吴德卫, 杨明, 郑凌云, 杨雁

**摘要** 目的 探究 3 种丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 抑制因子对转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 活化的大鼠肝星状细胞 (HSC) 中 Smad2/3 磷酸化及 Smad4 核转位的影响。方法 采用 IV 型胶原酶和链酶蛋白酶原位肝灌注法分离正常大鼠 HSC 并传代培养, 分别用细胞外信号调节激酶 (ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、p38 抑制因子 (PD98059、SP600125、SB203580) 与 HSC 共同培养, 再加入 TGF- $\beta$ 1 活化细胞, 采用免疫沉淀和 Western blot 法检测 pSmad2C、pSmad2L、pSmad3L 蛋白表达; 采用细胞免疫荧光法检测 Smad4 蛋白表达及细胞内定位情况。结果 Western blot 显示静息状态下 HSC 几乎不表达 pSmad2C 而低表达 pSmad2L、pSmad3L, TGF- $\beta$ 1 刺激后显著上调上述磷酸化蛋白表达, p38 抑制因子 (1、3  $\mu$ mol/L)、ERK 抑制因子 (1  $\mu$ mol/L) 对 Smad2C、Smad2L、Smad3L 磷酸化无显著影响; p38 抑制因子 (10  $\mu$ mol/L) 降低了 pSmad3L 蛋白表达; ERK 抑制因子 (3、10  $\mu$ mol/L) 降低了 pSmad2C 蛋白表达; JNK 抑制因子 (1、3、10  $\mu$ mol/L) 减少了 pSmad2C、pSmad2L、pSmad3L 蛋白表达。TGF- $\beta$ 1 刺激可明显诱导 Smad4 核转位, 而 3 种 MAPK 抑制因子不同程度地抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 Smad4 转位入核。结论 在 HSC 细胞中 TGF- $\beta$ 1 可能通过活化 JNK 通路促进 Smad2/3 磷酸化, 活化 ERK、JNK、p38 通路促进 Smad4 核转位。

**关键词** 大鼠肝星状细胞; 丝裂原活化蛋白激酶抑制因子; Smad2; Smad3; Smad4

中图分类号 R 349.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1243-05

肝纤维化的发生主要是由于细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的合成与降解失衡, 导致窦周间隙中 ECM 大量沉积, 引起正常肝脏结构被破坏<sup>[1-3]</sup>。肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 激活和转化为肌成纤维细胞, 进而合成大量的 ECM, 是导致肝纤维化发生的中心事件<sup>[4]</sup>。转化生长因子- $\beta$  (transforming grow factor beta, TGF- $\beta$ ) 能够促进 ECM 产生和组织纤维化, 是重要的促纤维化细胞

因子。TGF- $\beta$  一方面与受体结合后, 通过 Smads 传递信号入核, 调节靶基因的表达<sup>[5]</sup>。另一方面, TGF- $\beta$  可通过激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 通路, 包括细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和 p38 激酶, 活化的 MAPK 可促进 Smad 蛋白的磷酸化<sup>[6]</sup>。MAPK 信号通路与 Smad 信号通路相互作用可能在肝纤维化形成过程中发挥着重要的作用。该实验主要探究 ERK、JNK、p38 抑制因子对 TGF- $\beta$ 1 活化的 HSC 细胞中 Smad2/3 蛋白磷酸化及 Smad4 核转位的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株** 采用 IV 型胶原酶和链酶蛋白酶等二次灌注、密度梯度离心等方法分离正常大鼠 HSC 并传代培养。大鼠购于安徽医科大学实验动物中心, 系成年 SPF 级 SD 雄性大鼠。

**1.1.2 主要药品及试剂** 台盼蓝染液、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 新生胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; Western 及 IP 细胞裂解液购自江苏碧云天生物技术研究; protein-G-Sepharose beads 购自美国 GE Healthcare 公司; Recombinant Human TGF- $\beta$ 1 购自美国 R&D Systems 公司; 小鼠抗 Smad2/3 抗体购自美国 BD Transduction Laboratories<sup>TM</sup> 公司; 兔抗 pSmad2C 抗体购自美国 Cell Signaling technology 公司; 兔抗 Smad2/3 抗体、小鼠抗 Smad4 抗体均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; 兔抗 pSmad2L 抗体、兔抗 pSmad3L 抗体由日本关西医科大学冈崎教授惠赠; 小鼠抗 GAPDH、山羊抗小鼠、山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ERK、JNK 及 p38 (PD98059、SP600125、SB203580) 抑制因子均购自美国 Calbiochem 公司; PVDF 膜购自美国 Bio-Rad 公司, ECL 化学发光显影液购自美国 Thermo 公司; 电泳、转移相关试剂、DAPI 染料购自美国 Sigma 公司。

**1.1.3 主要仪器** GL-20A 全自动冷冻高速离心机

2015-03-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81073098、81374012)

作者单位: 安徽医科大学药理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 江宇峰, 男, 硕士研究生;

杨雁, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yangyan@ahmu.edu.cn

(湖南仪器仪表总厂离心机厂); YJ-1450 型医用净化工作台(北京冠鹏净化设备有限责任公司); Napco-6100 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国杜邦公司); 超纯水机(美国 Millipore 公司)、静音混悬器(太仓市科教器材厂); Western blot 检测全套设备(美国 Bio-Rad 公司); 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 HSC 细胞分离、鉴定和传代培养 用 IV 型胶原酶和链酶蛋白酶 E 酶原位肝灌注法消化细胞,密度梯度离心分离 HSC 细胞,反复培养纯化细胞,台盼蓝染色鉴定细胞活力。详细操作可参考文献<sup>[7-8]</sup>。

1.2.2 3 种抑制因子对 TGF-β1 诱导的 HSC 细胞内磷酸化 Smad2/3 蛋白表达的影响 实验分组:对照组、模型组(9 pmol/L TGF-β1 刺激; 1 h)、p38 抑制因子 3 个剂量组(SB203580: 1、3、10 μmol/L; 5 h)、ERK 抑制因子 3 个剂量组(PD98059: 1、3、10 μmol/L; 5 h)、JNK 抑制因子 3 个剂量组(SP600125: 1、3、10 μmol/L; 5 h) 3 种 MAPK 抑制因子、TGF-β1 浓度及作用时间设定,参考研究<sup>[9-10]</sup>。取对数生长期 HSC 细胞,以 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml 接种至 100 ml 培养皿中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后,更换无血清培养基培养过夜,分别于相应组别加 3 种抑制因子,继续培养 4 h 后,加入 TGF-β1(终浓度为 9 pmol/L)进行刺激 1 h,对照组加等体积溶媒。

1.2.3 免疫沉淀(IP)和 Western blot 法检测各组 HSC 细胞内磷酸化 Smad2/3 蛋白含量 结束后,采用 Western 及 IP 细胞裂解液抽提细胞总蛋白。各组蛋白样本中加小鼠抗 Smad2/3 抗体 4.5 μl 及 protein-G-Sepherose beads 50 μl 颠倒混匀后,置于静音混悬器上 4 °C 混悬过夜。次日 4 °C 3 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;加 TNE Buffer 1 ml/样,4 °C 3 000 r/min 离心 5 min,重复洗涤 1 次;弃上清液,加 2 × SDS-PAGE 上样 Buffer,50 μl/样本,混匀,变性(100 °C 水浴 10 min)。SDS-PAGE 电泳(10% 分离胶 5% 浓缩胶)分离蛋白、湿转(100 mA 2 h)、5% 脱脂奶粉封闭、洗膜、一抗 4 °C 孵育过夜、洗膜、相应二抗室温孵育 2 h、洗膜、ECL 化学发光显影。磷酸化 Smad2/3 蛋白半定量内参为 Smad2/3 蛋白,IgH 蛋白系免疫沉淀实验中所用抗体分解产物之一(免疫球蛋白重链分子),在此实验中,各样本含量一致,可作为内参。

1.2.4 3 种抑制因子对 TGF-β1 诱导的 HSC 细胞

内 Smad4 蛋白定位表达的影响 实验分组:对照组、模型组(9 pmol/L TGF-β1 刺激; 1 h)、ERK 抑制因子组(P9D9805: 10 μmol/L; 5 h)、JNK 抑制因子组(SP600125: 10 μmol/L; 5 h)、p38 抑制因子组(SB203580: 10 μmol/L; 5 h)。取对数生长期 HSC 接种于 24 孔板中,相应组别处理同上(1.2.1),培养结束后,弃培养液,4% 多聚甲醛固定 15 min,4 °C、0.1% 皂素和 0.5% BSA 打孔、封闭 30 min,一抗(1:50)4 °C 孵育过夜,异硫氰酸荧光素(FITC)耦联二抗(1:100)37 °C 孵育 1 h,DAPI(1:100)室温孵育 10 min。80% 甘油封片,荧光显微镜观察、摄片。

2 结果

2.1 p38、ERK 及 JNK 抑制因子对 HSC 细胞内 Smad2/3 磷酸化的影响 Western blot 显示各组 Smad2/3 的含量基本一致。在对照组中,pSmad2C 几乎不表达,pSmad2L、pSmad3L 呈现低表达。TGF-β1 刺激后,显著上调 pSmad2C、pSmad2L、pSmad3L 的表达。p38 抑制因子(1、3 μmol/L)略增加这 3 种蛋白磷酸化,10 μmol/L p38 抑制因子显著降低了 pSmad3L 蛋白表达;1 μmol/L ERK 抑制因子略增加这 3 种蛋白磷酸化,ERK 抑制因子(3、10 μmol/L)降低了 pSmad2C 蛋白表达;JNK 抑制因子(1、3、10 μmol/L)减少了 pSmad2C、pSmad2L、pSmad3L 蛋白磷酸化。整个实验过程中 pSmad3C 均不产生表达。见图 1。

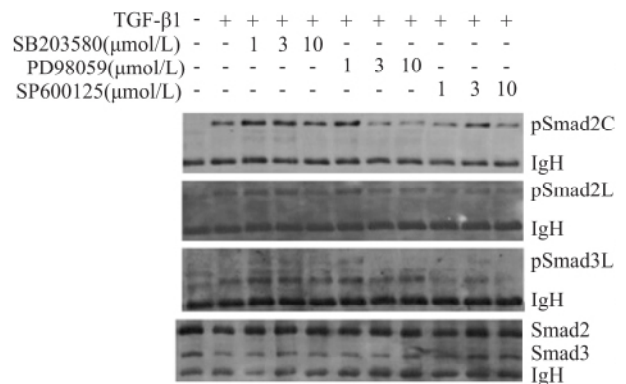


图 1 p38、ERK 及 JNK 抑制因子对 HSC 细胞内 Smad2/3 磷酸化的影响

2.2 ERK、JNK、p38 抑制因子对 HSC 细胞内 Smad4 蛋白定位表达的影响 免疫荧光染色显示各组细胞总蛋白中 Smad4 蛋白水平无显著性差异,模型组细胞质中 Smad4 含量明显减少,细胞核中

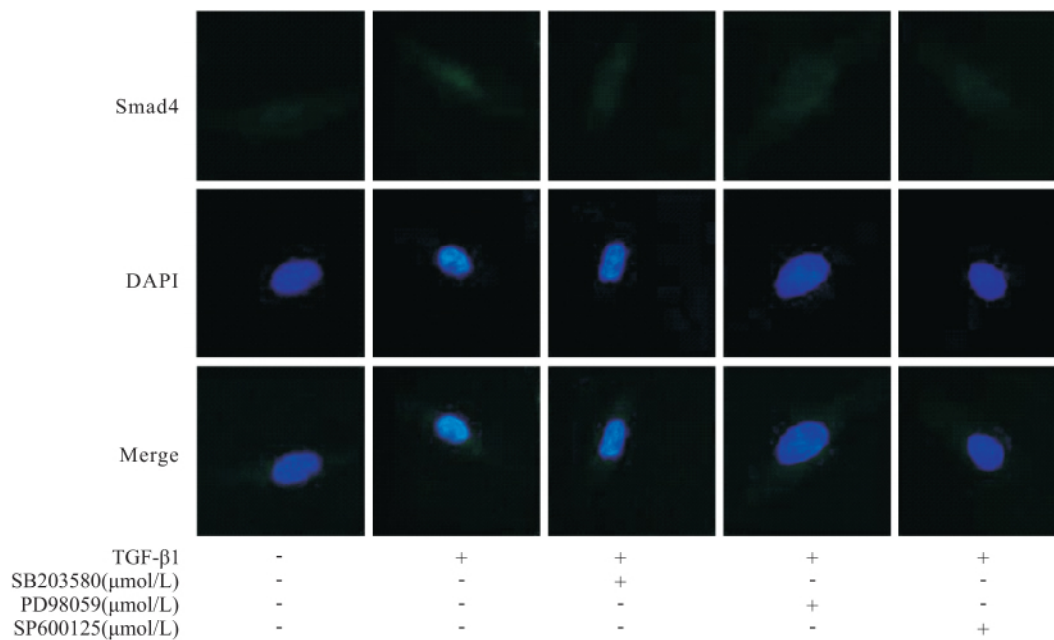


图2 ERK、JNK及p38抑制因子对HSC细胞内Smad4核转位的影响

Smad4水平显著上调;而ERK、JNK、p38抑制因子作用后,不同程度地抑制了TGF-β1诱导的Smad4的核转位,尤其p38抑制因子。见图2。

### 3 讨论

TGF-β是一类多功能细胞因子,参与调节多种细胞生长、增殖、分化和凋亡等生命活动,被认为是最强致纤维化因子,参与多种器官纤维化病变过程<sup>[11]</sup>。目前研究<sup>[3]</sup>表明,TGF-β1是活化HSC的主要细胞因子,可以促进胶原纤维和ECM的大量合成,加速纤维化的形成,是肝纤维化形成的主要促进因子。在慢性肝损伤中,TGF-β1主要通过HSC细胞的膜受体相结合,激活Smad信号通路,促使以胶原为主的ECM表达增加<sup>[12]</sup>。经典的TGF-β信号传导途径,即TGF-β/Smad信号通路,包括4个阶段:TGF-β配体结合靶细胞膜上II型TGF-β受体(TβR II),随即募集并活化I型TGF-β受体(TβR I);活化的TβR I促使Smad2/3 C-末端区磷酸化;磷酸化的Smad2/3与Smad4结合,即形成Smad2/3/4复合物;Smad2/3/4复合物转位入细胞核内,调节靶基因的表达<sup>[2]</sup>。本实验中,来源于正常大鼠的HSC,几乎不表达pSmad2C、pSmad3C,而外源性细胞因子TGF-β1刺激可显著诱导Smad2 C-末端区磷酸化,促进Smad4核转位,正向传递TGF-β信号向胞内传递。

MAPK,是一类信号蛋白,参与TGF-β信号在胞内的传递<sup>[13]</sup>。研究<sup>[14]</sup>证实在肺间质成纤维细胞中TGF-β1活化JNK、P38通路而促进细胞增殖;研究<sup>[4]</sup>显示在大鼠肌成纤维细胞中TGF-β1激活p38通路,可诱导Smad3连接区磷酸化(pSmad3L),导致ECM产生,从而促进肝纤维化发生;研究<sup>[15]</sup>显示在人类肾小球膜细胞中ERK抑制因子可抑制Smad2/3连接区磷酸化,从而促进I型胶原蛋白的合成;研究<sup>[10]</sup>表明在人类瘢痕疙瘩成纤维细胞中抑制ERK、JNK通路可明显抑制Smad4的核转位,抑制p38通路可显著抑制Smad2/3的磷酸化。以上研究表明在不同类型细胞中TGF-β1可能通过不同方式调控MAPK通路从而干预TGF-β/Smad信号转导。本实验采用MAPK所介导的3条经典通路ERK、JNK、p38通路特异性阻断剂,观察其对TGF-β1活化的HSC细胞内Smad2/3的磷酸化及Smad4蛋白表达和转位入核的影响。

在本研究中,ERK抑制因子(3、10 μmol)明显降低外源性TGF-β1刺激后升高的pSmad2C蛋白水平,而对Smad2/3连接区磷酸化无显著影响,且显著降低了核内Smad4蛋白水平(可直接反映核内Smad2/3/4复合物水平),这可能是由于ERK抑制因子阻断ERK通路所介导调控的HSC自分泌TGF-β1过程而影响Smad2 C-末端磷酸化和Smad2/3/4复合物形成所致。JNK抑制因子能够显著降低

Smad2/3 磷酸化蛋白水平和 Smad4 蛋白转位入核, 表明 JNK 通路即可直接干预 Smad2/3 连接区的磷酸化, 又可影响 HSC 自分泌 TGF- $\beta$ 1 过程, 是参与调控 HSC 激活的重要方式。10  $\mu$ mol p38 抑制因子可抑制 pSmad3L 蛋白表达而显著降低核内 Smad4 蛋白水平, 表明 p38 通路可能通过干预 Smad3 连接区的磷酸化和 Smad2/3/4 复合物的形成和转位而调控 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导。本实验结果表明, TGF- $\beta$ 1 可能通过调控 MAPK 通路而干预 HSC 细胞内 Smad2/3 磷酸化和 Smad2/3/4 复合物形成和转位, 为人们对肝纤维化的研究提供新的思路。

### 参考文献

- [1] Datta S, Ghosh A, Dasgupta D, et al. Novel point and combo-mutations in the genome of hepatitis B virus-genotype D: characterization and impact on liver disease progression to hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (10): e110012.
- [2] Matsuzaki K. Smad phosphoisoform signals in acute and chronic liver injury: similarities and differences between epithelial and mesenchymal cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347 (1): 225 - 43.
- [3] 李侠, 黄欢, 田小鹏等. 地顶孢霉菌丝体对免疫性肝纤维化大鼠的保护作用及可能机制的研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2012, 47 (2): 145 - 9.
- [4] Furukawa F, Matsuzaki K, Mori S, et al. p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts [J]. *Hepatology*, 2003, 38 (4): 879 - 89.
- [5] 何林蔓, 李曼, 周振华等. TGF- $\beta$ -Smad 转导途径在肝纤维化中的作用及中药干预的研究进展 [J]. *中国中医急症*, 2014, 23 (6): 1101 - 4.
- [6] Javelaud D, Mauviel A. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF- $\beta$ : implications for carcinogenesis [J]. *Oncogene*, 2005, 24 (37): 5742 - 50.
- [7] Yoshida K, Matsuzaki K, Mori S, et al. Transforming growth factor- $\beta$  and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury [J]. *Am J Pathol*, 2005, 166 (4): 1029 - 39.
- [8] 袁丽萍, 陈飞虎, 鹿玲等. 鬼针草总黄酮对肝纤维化大鼠肝星状细胞 TGF- $\beta$ 1 信号传导通路的影响 [J]. *中国药理学通报* 2009, 25 (12): 1655 - 9.
- [9] 王玉美, 梁佳玉, 杨雁. 3 种 MAPK 抑制因子对 HepG2 细胞中 Smad2/3 磷酸化的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2006, 41 (6): 648 - 50.
- [10] He S, Liu X, Yang Y, et al. Mechanisms of transforming growth factor  $\beta$ 1/Smad signalling mediated by mitogen-activated protein kinase pathways in keloid fibroblasts [J]. *Br J Dermatol*, 2010, 162 (3): 538 - 46.
- [11] Schuppan D, Koda M, Bauer M, et al. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets [J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2000, 63 (4): 366 - 70.
- [12] 林红, 蔡钢, 杨百京等. 黄芪后处理对大鼠肝纤维化中的影响及 TGF- $\beta$ 1/Smad2、p38MAPK 作用 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2014, 16 (2): 410 - 5.
- [13] 刘浩, 魏伟. TGF $\beta$  信号转导通路及其为靶点的肝纤维化治疗 [J]. *中国药理学通报* 2007, 23 (5): 561 - 5.
- [14] Khalil N, Xu Y D, O'Connor R, et al. Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (52): 43000 - 9.
- [15] Hayashida T, Decaestecker M, Schnaper H W. Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF-beta-dependent responses in human mesangial cells [J]. *FASEB J*, 2003, 17 (11): 1576 - 8.

## Effects of MAPK inhibitors on phosphorylation of Smad2/3 and nuclear translocation of Smad4 in HSCs

Jiang Yufeng, Wu Chao, Wu Jiajun, et al

(Dept of Pharmacology, The First Affiliated Hospital Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the effects of three MAPK inhibitors on phosphorylation of Smad2/3 and nuclear translocation of Smad4 in TGF- $\beta$ 1-activated hepatic stellate cell (HSC). **Methods** HSC was isolated from normal rat liver by using collagenase IV and pronase-E digestion in situ and continuously cultured *in vitro*. The cells in log phase were pretreated with ERK inhibitor (PD98059), JNK inhibitor (SP600125) and p38 inhibitor (SB203580) in corresponding group respectively, then activated by TGF- $\beta$ 1. The protein expressions of phosphorylated (p) Smad2C, pSmad2L and pSmad3L were measured by immunoprecipitation (IP) and western blot assay. The protein expression and intracellular localization of Smad4 were assessed by cell immunofluorescence assay. **Results** The protein expressions of phosphorylated Smad2C, Smad2L and Smad3L were feeble in quiescent

# IGF-1 及 IGF-1R 在 SD 大鼠前列腺组织中的表达

熊宇<sup>1</sup> 黄涛<sup>1</sup> 吴奎<sup>1</sup> 刘治<sup>1</sup> 周杭城<sup>2</sup>

**摘要** 目的 研究不同饮食和丙酸睾酮对 SD 大鼠前列腺组织的改变及胰岛素生长因子(IGF)-1、IGF-1R 的表达强度。方法 采用高脂高糖饲料饮食及去势后皮下注射丙酸睾酮建造前列腺增生模型,40 d 后处死大鼠;取出前列腺组织,称重并 HE 染色观察前列腺增生情况;用免疫组化法检测前列腺组织中 IGF-1、IGF-1R 的表达强度。结果 高脂高糖饮食组前列腺组织增生,IGF-1、IGF-1R 的表达强度均高于普通饮食组( $P < 0.05$ );去势+低剂量丙酸睾酮皮下注射组前列腺组织明显增生,IGF-1、IGF-1R 的表达强度明显增加( $P < 0.05$ )。结论 高脂高糖饮食及低剂量丙酸睾酮均可促进大鼠前列腺组织的增生,IGF-1、IGF-1R 与前列腺增生的发展呈正相关性。

**关键词** 高脂高糖;丙酸睾酮;前列腺指数;前列腺增生;胰岛素生长因子 1;胰岛素生长因子 1 受体

中图分类号 R 697.32

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1247-05

前列腺增生是一种缓慢的渐进的老年男性常见疾病<sup>[1]</sup>,约 2/3 患者有尿频、尿急、夜尿增多症状,进而出现进行性排尿困难,严重影响老年男性的生活质量和睡眠模式<sup>[2]</sup>。近年来中国人口老龄化加剧,

饮食结构改变明显,前列腺增生发病率显著升高。该研究通过高糖高脂饮食喂养 SD 大鼠并对去势大鼠皮下注射不同剂量的丙酸睾酮建立大鼠前列腺增生模型,并对前列腺组织进行免疫组织化学染色,探讨高脂高糖饮食及外源性睾酮对 SD 大鼠前列腺的影响及 IGF-1、IGF-1R 与大鼠前列腺增生发生发展的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物分组及饲养条件

**1.1.1 SD 大鼠选择及分组** 健康清洁级 SD 雄性大鼠 40 只,120~200 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,以上 SD 大鼠先给予普通饲料适应性喂养 3 d,第 4 天所有大鼠随机分为普通饮食组(A 组)和高脂高糖饮食组(B 组),两组大鼠再随机各分 4 组,每组各 5 只。A1 组:普食饮食未处理;A2 组:普通饮食+手术去势+生理盐水 5 mg/(kg·d)皮下注射;A3 组:普通饮食+手术去势+睾酮 2 mg/(kg·d)皮下注射;A4 组:普通饮食+手术去势+睾酮 5 mg/(kg·d)皮下注射;B1 组:高糖高脂饮食未处理;B2 组:高糖高脂饮食+手术去势+生理盐水 5 mg/(kg·d)皮下注射;B3 组:高糖高脂饮食+手术去势+睾酮 2 mg/(kg·d)皮下注射;B4 组:高糖高脂饮食+手术去势+睾酮 5 mg/(kg·d)皮下注射。

**1.1.2 饲养条件和饲料配方** 室温(22±2)℃,

2015-03-31 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1408085QH152)

作者单位:安徽医科大学附属省立临床学院<sup>1</sup>泌尿外科,<sup>2</sup>病理科,合肥 230001

作者简介:熊宇,男,硕士研究生;

吴奎,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wukuim-nwk@sohu.com

HSC, while markedly increased by TGF- $\beta$ 1 stimulation. The two concentrations of p38-specific inhibitor (1, 3  $\mu$ mol/L) and low concentration ERK-specific inhibitor (1  $\mu$ mol/L) had no significant effect on the phosphorylation of Smad2/3; the high concentration of p38-specific inhibitor (10  $\mu$ mol/L) significantly down-regulated elevated pSmad2C by TGF- $\beta$ 1; the two concentrations of ERK-specific inhibitor (3, 10  $\mu$ mol/L) could remarkably decrease elevated pSmad2C by TGF- $\beta$ 1; the three concentrations of JNK-specific inhibitor (1, 3, 10  $\mu$ mol/L) inhibited the phosphorylation of Smad2C, Smad2L and Smad3L stimulated by TGF- $\beta$ 1. All three MAPK-specific inhibitors suppressed increased nuclear translocation of Smad4 protein in TGF- $\beta$ 1-stimulated HSCs. **Conclusion** The phosphorylation of Smad2/3 and nuclear translocation of Smad4 might be induced by TGF- $\beta$ 1 via activating ERK, JNK, p38 pathways in HSCs.

**Key words** HSCs; MAPK inhibitors; Smad2; Smad3; Smad4