

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2016) 04-0315-05

## 5-ASA 对炎症性肠病大鼠结肠组织中 TGFβ1/smads 信号通路的影响

殷勤, 施会敏, 曲高婷, 张爱青, 甘卫华

(南京医科大学第二附属医院 儿科, 江苏 南京 210003)

**【摘要】**目的: 应用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS) 诱导的大鼠结肠炎模型研究 TGFβ1/smads 信号途径在 5-氨基水杨酸(5-ASA) 抗炎过程中的作用。方法: 80 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为对照组( $n=20$ )、造模组( $n=20$ )、TNBS+5-ASA 口服组( $n=20$ )、TNBS+5-ASA 灌肠组( $n=20$ ) 采用疾病活动指数、大体评分和组织学评分评价 TNBS 诱导结肠炎的严重程度, 通过 RT-PCR 和 Western blot 检测 TGFβ1、smad2、smad3、smad4 和 smad7 mRNA 和蛋白的表达量。结果: 造模组 smad2、smad3、smad4 mRNA 和蛋白表达量明显下降, 而 smad7 的 mRNA 和蛋白表达量明显升高。5-ASA 口服和灌肠均可以上调 smad2、smad3 和 smad4 mRNA 和蛋白表达, 下调 smad7 的 mRNA 和蛋白表达, 且 5-ASA 灌肠均优于 5-ASA 口服。结论: 5-ASA 可能通过调节 TGFβ1/smads 途径的信号转导来改善肠黏膜炎症。

**【关键词】**TGFβ1; smads; 5-氨基水杨酸; 炎症性肠病

**【中图分类号】**R 574.62 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2016.04.003

## 5-aminosalicylic acid relieves the intestinal inflammation through the TGFβ1/smads signaling pathway in animal model of inflammatory bowel disease

YIN Qin, SHI Huimin, QU Gaoting, ZHANG Aiqing, GAN Weihua

Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003, China

**【Abstract】Objective:** To observe the effect of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) on the TGFβ1/smads signaling pathway in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rat models. **Methods:** Eighty Sprague-Dawley rats were equally randomized into control group, model group, TNBS+5-ASA (oral) and TNBS+5-ASA (enema) ( $n=20$  for each). The severity of TNBS-induced colitis was assessed using the Disease Activity Index scores, Colon Macroscopic Damage Index and the Histopathological Score. Real-time PCR and western blot were then performed to examine the expression of TGFβ1, smad2, smad3, smad4 and smad7 in each group of rats. **Results:** Exposure to TNBS+ethanol resulted in a marked decrease in the mRNA and protein expression of smad2, smad3 and smad4, yet increase of smad7. Treatment with TNBS+5-ASA by oral or enema had up-regulated the mRNA and protein expression of smad2, smad3 and smad4, yet down-regulated the expression of smad7. Nevertheless, administration of 5-ASA by enema was superior to oral use in improving the intestinal inflammation and mucosal injury. **Conclusion:** 5-ASA relieves the intestinal inflammation through the TGFβ1/smads signaling pathway in animal model of inflammatory bowel disease.

**【Key words】**TGFβ1; smads; 5-ASA; inflammatory bowel disease

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD) 是一类以反复发作和缓解为临床特征的肠黏膜慢性炎症性疾病<sup>[1-2]</sup>。5-氨基水杨酸(5-ASA) 是治疗炎症性肠病的主要药物之一<sup>[3]</sup>。转化生长因子 β (transforming growth factor β, TGFβ) 是一类分泌型多肽类生长因子, TGFβ/smads 信号途径在细胞及生物体的生长和发育过程中起重要作用, 而且与上皮间质转

化(EMT) 密切相关。目前已知在炎症性肠病中有 TGFβ/smads 信号途径的参与<sup>[4]</sup>, 而关于 5-ASA 是否能够调节炎症性肠病中的 TGFβ/smads 信号途径, 从而改善肠黏膜炎症及损伤却鲜有报道。本文应用 TNBS 诱导大鼠结肠炎模型并给予 5-ASA 治疗, 初步探讨 TGFβ/smads 信号途径在 5-ASA 抗炎过程中的作用。

收稿日期: 2016-01-27

作者简介: 殷勤(1968-), 女, 副主任医师, (电话) 18951762773, (电子信箱) njyinqin@163.com;

张爱青, 男, 副主任医师, (电子信箱) njaiqing@njmu.edu.cn, 通信作者。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 6~8 周龄 SPF 级健康 Sprague-Dawley 大鼠 80 只,体质量 150~180 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.1.2 药物与试剂 TGFβ1、smad2/3、p-smad2/3、smad4、smad7、GAPDH 抗体购自美国 Cell Signaling Technology ,TGFβ1、smad2、smad3、smad4、smad7、GAPDH 引物由上海生工生物工程设计合成。TNBS 购自美国 Sigma 公司。5-ASA 口服剂(美沙拉秦缓释颗粒剂,艾迪莎)产自法国爱的发制药集团。5-ASA 灌肠剂(莎尔福灌肠液)产自瑞士 Vifor AG Zweigniederlassung Medichemie Ettingen。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 造模与取材 大鼠饲养于上海斯莱克实验动物有限责任公司。实验前适应性饲养 1 周,饲养条件为:温度(22±2)℃,湿度(55±5)% ,正常饮食。实验前一天禁水不禁食、24 h 后随机分为四组:对照组(n=20)、TNBS 组(n=20)、TNBS+5-ASA 口服组(n=20)、TNBS+5-ASA 灌肠组(n=20)。实验第 1 天将 5%TNBS 和无水乙醇以体积比 1:1 混合制成含 2.5 mg/mL TNBS 的 50%乙醇溶液(造模液),给大鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠 1 mL/kg 体质量麻醉。取蝶翼采血针,剪去针头,取其软管,一端接上 1 mL 注射器,另一端涂上石蜡油后从肛门插入肠道,TNBS 组、TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组给予 100 mg/kg 体质量的造模液,对照组给予等体积的 50%乙醇,在距离肛门 8~10 cm 处灌肠,灌好后拔出软管,保持大鼠头朝下倒立 30 s 左右,以保证混合液到达全部结肠。造模完成后,大鼠平卧至清醒,饲养于 SPF 级环境,给予正常饮食,每日观察其精神状态、进食、活动和大便性状等,并记录其体质量。每天取其粪便做隐血试验。实验第 3 天开始 TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组分别给予 100 mg/kg 5-ASA 口服和灌肠,实验第 8 天处死所有大鼠,取结肠组织并分成三部分,一部分置于冻存管中-70℃保存用于提取 RNA,一部分置于冻存管中-70℃保存用于提取蛋白,剩余的组织放入 4%多聚甲醛中进行固定,石蜡包埋后制备组织切片(厚度 4 μm)。

1.2.2 TNBS 诱导的结肠炎严重程度评估 每日记录大鼠体质量变化,观察大便性状,检测大便隐血,按照 Murthy 等<sup>[5]</sup>制定的标准进行疾病活动指数(disease activity index scores,DAI)评分<sup>[6]</sup>。取材时肉眼观察肠黏膜有无损伤、充血水肿及溃疡,对结肠

进行大体评分(colon macroscopic damage index,CM-DI),参考 Wallace JL 制定的标准<sup>[7]</sup>。光学显微镜下观察结肠白细胞浸润程度、杯状细胞形态、血管密度及肠壁厚度,进行组织学评分(histopathological score,HPS),参考 Lahat G 的评分标准<sup>[8]</sup>。

1.2.3 RT-PCR 提取大鼠结肠组织 RNA 并进行逆转录,逆转录条件为 37℃ 15 min,85℃ 5 s,所得到的 cDNA 在 Mastercycler ep realplex4 PCR 系统上进行 RT-PCR 反应,反应条件为 95℃ 预变性 1 min,随后 40 个循环的 95℃ 5 s,60℃ 30 s。GAPDH 作为内参。TGFβ1、smad2、smad3、smad4、smad7、GAPDH 的引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

		引物序列
TGFβ1	上游	5'-GGACTACTACGCCAAAGAAG-3'
	下游	5'-TCAAAAGACAGCCACTCAGG-3'
smad2	上游	5'-AAGCCATCACCCTCAGAATTG-3'
	下游	5'-CACTGATCTACCGTATTGCTGT-3'
smad3	上游	5'-GGTGTGGGCTCTACTACATT-3'
	下游	5'-CTGGTCACTGTCTGTCTCTCTGT-3'
smad4	上游	5'-AGGTGGCTGGTCGAAAG-3'
	下游	5'-TTGTTGGATGTTGGATGTTT-3'
smad7	上游	5'-GGTGCTCAAGAACTCAAGGAG-3'
	下游	5'-AGTAAGGAGGAGGGGAGACT-3'
GAPDH	上游	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCTGAT-3'
	下游	5'-AGCCTTCTCCATGCTGCTGAAGAC-3'

1.2.4 Western blot 提取大鼠结肠组织总蛋白并测定蛋白浓度,每个样品加 40 mg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,320 mA 90 min 转膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h,4℃ 孵育 TGFβ1、smad2/3、p-smad2/3、smad4、smad7 一抗过夜,然后室温孵育二抗 2 h,加显影液后曝光,GAPDH 作为内参。

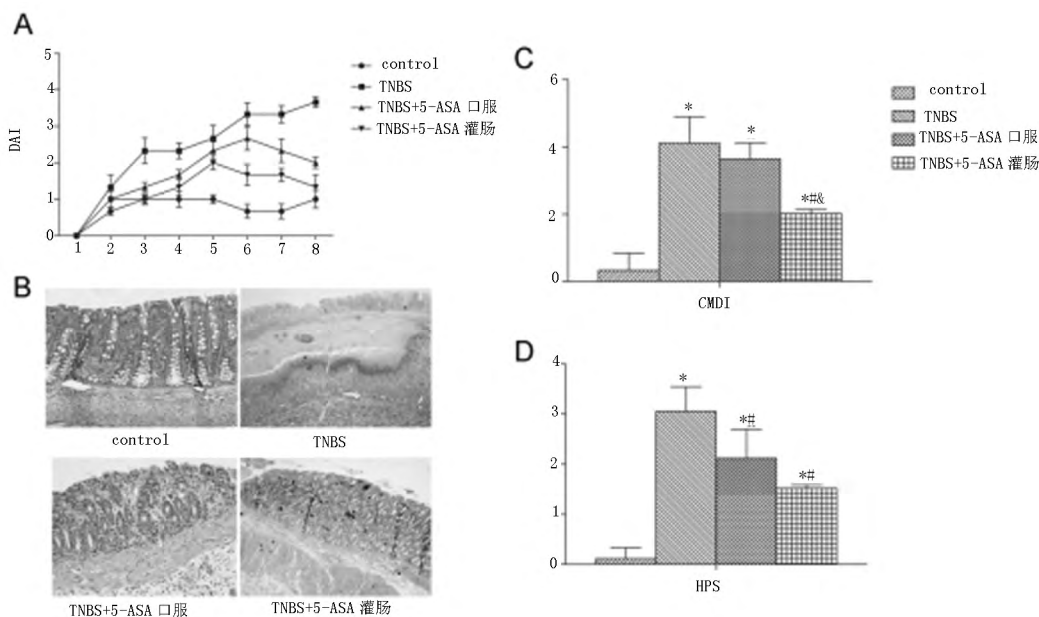
1.3 统计学分析 计量数据以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 20.0 统计软件,组间比较采用成组设计单因素方差分析和 LSD-t 检验,P<0.05 表示差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 TNBS 诱导的结肠炎严重程度评估 TNBS 组大鼠在灌肠后出现厌食、懒动、竖毛,体质量明显减轻,糊状或水样的肉眼血便,并带有较多的黏液和脓液;对照组大鼠仅在实验第 1~2 天出现轻度厌食、倦怠和稀便,体质量无减轻,粪便不带有黏液和脓

血; TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组出现轻度体质量下降、厌食和懒动,粪便糊状,无肉眼血便但粪便隐血试验阳性,无黏液和脓液,其中 5-ASA 灌肠组略好于 5-ASA 口服组。期间各组体质量数据见表 1。从实验第 3 天开始, TNBS 组大鼠的 DAI 评分明显增高,且维持在高水平,而 TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组的 DAI 评分显著低于 TNBS 组(图 1A)。TNBS 组大鼠结肠与周围组织器官粘连明显,不易分离,剖开结肠后可见明显充血水肿、出血、糜烂和散在溃疡形成,重者可见坏死,肠壁显著增厚;而 TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组大鼠结肠与周围组织粘连较轻,结肠壁有明显充血水肿、出血和糜烂,但无溃疡形成,亦无坏死; TNBS 组、TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+

5-ASA 灌肠组的 CMDI 评分均高于对照组,而 TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组低于 TNBS 组,其中 5-ASA 灌肠组低于 5-ASA 口服组(图 1C)。组织病理结果显示 TNBS 组大鼠结肠黏膜上皮损伤、缺失、糜烂及溃疡形成,固有层腺体变形、排列紊乱,黏膜及黏膜下层见密集分布的淋巴细胞、单核细胞及中性粒细胞浸润,而 TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组大鼠结肠黏膜上皮有轻度的损伤、缺失和糜烂,但无溃疡形成,黏膜及黏膜下层淋巴细胞、单核细胞及中性粒细胞浸润少于 TNBS 组,肠壁厚度也小于 TNBS 组(图 1B); TNBS 组 HPS 评分较对照组升高,而 TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组均低于 TNBS 组,但 5-ASA 口服组和 5-ASA 灌肠组之间无统计学差异(图 1D)。



A. 各组大鼠每日 DAI 评分; B. 各组大鼠结肠组织 HE 染色(100×); C. 各组大鼠 CMDI 评分; D. 各组大鼠 HPS 评分。

\* 与对照组比较  $P < 0.05$  #与 TNBS 组比较  $P < 0.05$  & 与 TNBS+5-ASA 口服比较  $P < 0.05$ 。

图 1 TNBS 诱导的结肠炎严重程度评估

表 2 各组大鼠体质量变化

g

组别	day1	day2	day3	day4	day5	day6	day7	day8
对照组	161.1±8.9	164.4±6.3	167.2±5.1	171.0±3.4	172.4±9.5	178.4±6.9	185.1±5.5	188.1±3.7
TNBS 组	162.7±7.3	160.0±6.7	154.4±7.6*	155.4±17.2*	151.3±4.7*	144.8±7.1*	138.9±2.5*	131.5±6.8*
TNBS+5-ASA 口服组	165.4±8.9	161.9±10.1	159.7±15.6	159.9±14.3	163.9±15.1	162.8±14.0#	165.6±10.5*#	166.4±17.3*#
TNBS+5-ASA 灌肠组	164.2±4.8	160.3±8.5	158.3±10.8	161.7±8.8	162.8±11.1	163.6±12.1#	167.2±8.2*#	169.8±7.4*#
F 值	1.18	1.25	4.95	5.74	10.60	27.62	95.37	77.28
P 值	0.3221	0.2995	0.0036	0.0014	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

\* 与对照组比较  $P < 0.05$  #与 TNBS 组比较  $P < 0.05$ 。

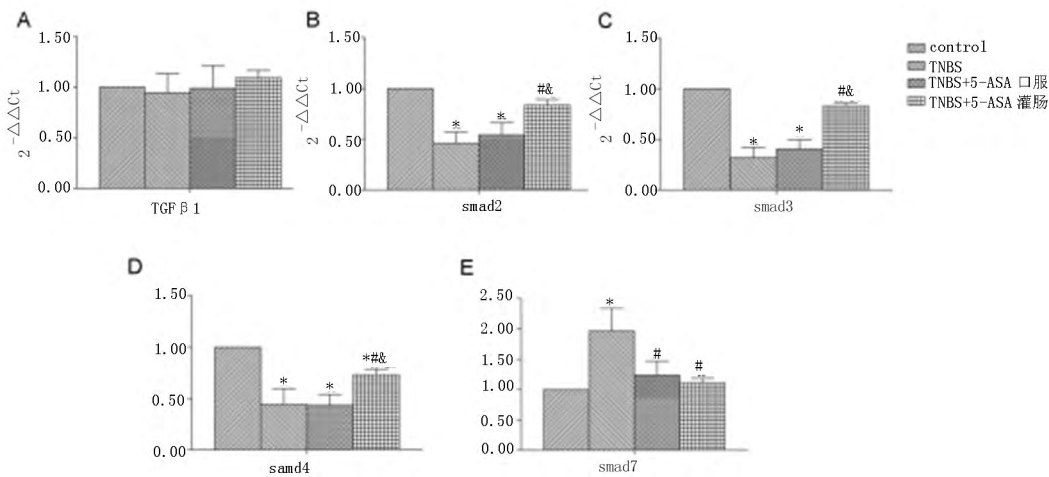
2.2 RT-PCR 检测 TNBS 诱导的结肠炎以及 5-ASA 治疗后结肠组织中 TGFβ1、smad2、smad3、smad4、smad7 的表达 RT-PCR 检测结果显示四组的

TGFβ1 mRNA 表达量无统计学差异(图 2A,  $P > 0.05$ ); TNBS 组的 smad2、smad3 和 smad4 mRNA 的表达量均低于对照组(图 2B~D,  $P < 0.05$ ), TNBS+5-

ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组的 smad2、smad3 和 smad4 mRNA 的表达量较 TNBS 组升高,而 TNBS+5-ASA 灌肠组高于 TNBS+5-ASA 口服组(图 2B~D,  $P<0.05$ ); TNBS 组的 smad7 mRNA 的表达量较对照组升高(图 2E,  $P<0.05$ ),而 TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组比 TNBS 组降低,但是两组之间无统计学差异(图 2E,  $P<0.05$ )。

2.3 Western blot 检测 TNBS 诱导的结肠炎以及 5-ASA 治疗后结肠组织中 TGFβ1、smad2/3、p-smad2/3

3、smad4、smad7 的表达 Western blot 检测结果显示四组的 TGFβ1 和 smad2/3 蛋白表达量无统计学差异;而 TNBS 组的 p-smad2/3 和 smad4 蛋白表达量低于对照组, TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组均比 TNBS 组升高, TNBS+5-ASA 口服组和 TNBS+5-ASA 灌肠组之间无统计学差异; smad7 蛋白在 TNBS 组的表达量高于对照组,而口服 5-ASA 和 5-ASA 灌肠后其表达量均下降,其中 5-ASA 灌肠组低于 5-ASA 口服组(表 3、图 3)。



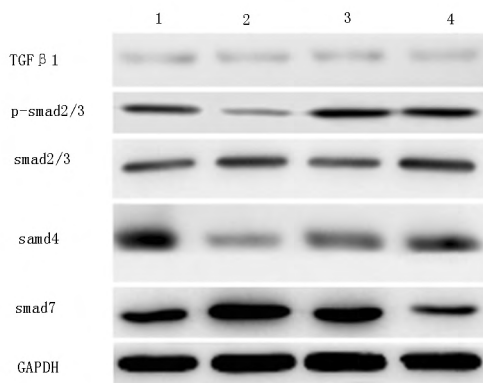
\* 与对照组比较  $P<0.05$  #与 TNBS 组比较  $P<0.05$  & 与 TNBS+5-ASA 口服比较  $P<0.05$ 。

图 2 TNBS 诱导的结肠炎以及 5-ASA 治疗后结肠组织中 TGFβ1、smad2、smad3、smad4、smad7 mRNA 的表达

表 3 TNBS 诱导的结肠炎以及 5-ASA 治疗后结肠组织中 TGFβ1、smad2/3、p-smad2/3、smad4、smad7 蛋白的表达量

组别	TGFβ1	smad2/3	p-smad2/3	smad4	smad7
对照组	0.148±0.093	2.633±0.981	1.002±0.092	2.116±0.889	0.738±0.233
TNBS 组	0.139±0.068	2.750±0.798	0.303±0.167*	0.601±0.734*	3.075±0.841*
TNBS+5-ASA 口服组	0.124±0.012	2.459±0.067	1.527±0.872#	1.018±0.336* #	1.368±0.747#
TNBS+5-ASA 灌肠组	0.126±0.066	2.974±1.234	1.342±0.374#	1.315±0.454#	0.681±0.446#&
F 值	0.17	0.36	7.46	5.96	19.73
P 值	0.9133	0.7836	0.0015	0.0045	0.0000

\* 与对照组比较  $P<0.05$  #与 TNBS 组比较  $P<0.05$  & 与 TNBS+5-ASA 口服组比较  $P<0.05$ 。



1: 对照组; 2: TNBS 造模组; 3: TNBS+5-ASA 口服组; 4: TNBS+5-ASA 灌肠组。

图 3 TNBS 诱导的结肠炎以及 5-ASA 治疗后结肠组织中 TGFβ1、smad2/3、p-smad2/3、smad4、smad7 蛋白的表达

### 3 讨论

炎症性肠病是一组未知原因的肠黏膜慢性炎症性疾病。促炎性细胞因子(如 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、TNF-α、INF-γ 等)与抗炎性细胞因子(如 IL-4、IL-10、IL-13、TGFβ 等)之间的失衡是引起肠黏膜损伤的重要因素<sup>[9]</sup>。

TGFβ/smds 信号途径在细胞及生物体的生长和发育过程中起重要作用。在 TGFβ1/smds 信号途径中, TGFβ1 与膜受体的结合导致 TβR II 磷酸化并激活 TβR I, TβR I 可以磷酸化并激活 smad2 和 smad3, 而磷酸化的 smad2 和 smad3 协同 smad4 转位到细胞核中, 调节靶基因的转录过程<sup>[10]</sup>。smad6、

smad7 可以竞争性地结合 T $\beta$ R I ,进而抑制 TGF $\beta$ /smads 途径的信号转导。

smad3 在 TGF $\beta$ 1 介导的抗炎作用中起重要的作用 ,干扰 smad3 导致细胞对 TGF $\beta$ 1 的反应性减弱 而 smad3 缺陷小鼠胃肠道 T 细胞浸润明显增加 并有脓肿形成<sup>[11]</sup>。阻断内源性 TGF $\beta$ 1 的活性导致炎症因子的合成增加 ,说明 TGF $\beta$ 1 在负调控人类肠道中炎症因子的合成中起关键作用<sup>[12]</sup>。smad6 和 smad7 的上调与 TGF $\beta$ /smads 信号途径的抑制相关<sup>[10,13]</sup> ,IBD 病人肠黏膜组织和 LPMCs 中表达高水平的 smad7。5-ASA 是 IBD 的治疗药物之一 ,本研究应用 TNBS 诱导的大鼠结肠炎模型 ,并给予 5-ASA 口服和灌肠治疗 ,发现 TNBS 诱导的大鼠结肠炎中 TGF $\beta$ 1 和总 smad2/3 并没有变化 ,但是 p-smad2/3 和 smad4 含量却显著下降 ,而 smad7 的表达明显升高 ,我们推测这种情况的出现可能是 IBD 导致抑制性 smad7 的表达升高 ,smad7 可以竞争性地结合 T $\beta$ R I ,阻止了 T $\beta$ R I 结合并磷酸化 smad2 和 smad3 ,因此尽管 TGF $\beta$ 1 和总 smad2/3 并没有变化 ,但是 smad2/3 磷酸化程度降低 ,从而抑制了 TGF $\beta$ 1/smads 途径的信号转导 ,导致过度的炎症因子的合成与释放 ,抗炎因子与炎症因子的平衡失调 ,造成肠黏膜损伤。而应用 5-ASA 可以显著降低抑制性 smad7 的表达 ,解除了 smad7 对 T $\beta$ R I 的抑制作用 ,p-smad2/3 和 smad4 的表达增加 ,激活 TGF $\beta$ 1/smads 途径的信号转导 ,使得抗炎因子与炎症因子得以平衡 ,因而可以改善 TNBS 诱导的大鼠结肠炎的症状以及肠黏膜炎症。哺乳动物中 TGF $\beta$  有 TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2 和 TGF $\beta$ 3 等三种异构体 ,TGF $\beta$  超家族还有其他众多成员 ,因此 ,虽然总 TGF $\beta$ 1 没有变化 ,但可能存在其他分子的代偿性变化来调节 smad2/3 的磷酸化和 TGF $\beta$ 1/smads 途径的信号转导 ,有待于进一步的研究。本研究还发现 5-ASA 灌肠组的效果要优于 5-ASA 口服组 ,这可能与 5-ASA 主要在肠黏膜局部发挥作用的特性有关。

综上所述 5-ASA 对 IBD 的治疗作用除了通过调节炎症介质的合成和炎症细胞的功能以及清除反应性氧化代谢产物之外 ,还可能通过调节 TGF $\beta$ 1/smads 途径的信号转导来改善肠黏膜炎症 ,5-ASA

与 TGF $\beta$ 1/smads 信号途径激活剂协同治疗可能是 IBD 的治疗的新方向之一。

#### 【参考文献】

- [1] DE ALMEIDA AB ,SANCHEZ-HIDALGO M ,MARTIN AR *et al.* Anti-inflammatory intestinal activity of *Arctium lappa* L. ( Asteraceae ) in TNBS colitis model [J]. *J Ethnopharmacol* ,2013 ,146 ( 1 ) : 300-310.
- [2] STROBER W. Impact of the gut microbiome on mucosal inflammation [J]. *Trends Immunol* ,2013 ,34 ( 9 ) : 423-430.
- [3] 欧阳钦 ,温忠慧. 氨基水杨酸药理作用研究进展 [J]. *中国药理学通报* ,1998 ,14 ( S1 ) : 83-85.
- [4] MONTELEONE G ,BOIRIVANT M ,PALLONE F *et al.* TGF- $\beta$ 1 and Smad7 in the regulation of IBD [J]. *Mucosal Immunol* ,2008 ,1 Suppl 1: S50-S53.
- [5] MURTHY SN ,COOPER HS ,SHIM H *et al.* Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin [J]. *Dig Dis Sci* ,1993 ,38 ( 9 ) : 1722-1734.
- [6] ZHANG Y ,ZHOU R ,ZHOU F *et al.* Total glucosides of peony attenuates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid/ethanol-induced colitis in rats through adjustment of TH1/TH2 cytokines polarization [J]. *Cell Biochem Biophys* ,2014 ,68 ( 1 ) : 83-95.
- [7] WALLACE JL ,KEENAN CM. An orally active inhibitor of leukotriene synthesis accelerates healing in a rat model of colitis [J]. *Am J Physiol* ,1990 ,258 ( 4 Pt 1 ) : G527-G534.
- [8] LAHAT G ,HALPERIN D ,BARAZOVSKY E *et al.* Immunomodulatory effects of ciprofloxacin in TNBS-induced colitis in mice [J]. *Inflamm Bowel Dis* ,2007 ,13 ( 5 ) : 557-565.
- [9] 施颖琦. 细胞因子在炎症性肠病免疫调节中的研究进展 [J]. *交通医学* ,2009 ,23 ( 3 ) : 310-313.
- [10] HELDIN CH ,MIYAZONO K ,TEN DP. TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins [J]. *Nature* ,1997 ,390 ( 6659 ) : 465-471.
- [11] YANG X ,LETTERIO JJ ,LECHLEIDER RJ *et al.* Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- $\beta$  [J]. *EMBO J* ,1999 ,18 ( 5 ) : 1280-1291.
- [12] DI SABATINO A ,PICKARD KM ,RAMPTON D *et al.* Blockade of transforming growth factor  $\beta$  upregulates T-box transcription factor T-bet and increases T helper cell type 1 cytokine and matrix metalloproteinase-3 production in the human gut mucosa [J]. *Gut* ,2008 ,57 ( 5 ) : 605-612.
- [13] NAKAO A ,AFRAKHTE M ,MOREN A *et al.* Identification of Smad7 as a TGF $\beta$ -inducible antagonist of TGF- $\beta$  signalling [J]. *Nature* ,1997 ,389 ( 6651 ) : 631-635.