牛珀至宝微丸对内毒素肺损伤纤维化大鼠信号转导蛋白 smads 表达的影响[※]

● 张蓉^{1*} 杜少辉^{1*} 黎辉² 杨丽娜¹ 陈阳艳¹ 黄玮¹ 陈东风² 李伊为²

摘要 目的:观察牛珀至宝微丸对内毒素肺损伤纤维化大鼠中转化生长因子- β 下游胞内信号转导蛋白 Smads 表达的影响。方法:气管内两次滴注脂多糖内毒素(1.5mg/kg,3.0mg/kg)、腹腔注射脂多糖内毒素(3.0mg/kg)造成内毒素大鼠急性肺损伤纤维化模型,设正常组对照,用牛珀至宝微丸作干预处理,以 HE 染色法观察肺组织损伤的形态学改变, Van Gieson 法染色检测胶原纤维在肺组织内的表达,并用 Western Blot、免疫组化方法检测在肺组织内 TGF- β 下游胞内信号转导蛋白 Smads 的表达。结果:内毒素造成严重的急性肺损伤,牛珀至宝微丸可以使内毒素肺损伤纤维化大鼠的 smad2/3 表达得到抑制, smad4 和 smad7 表达得到不同程度的增强。结论:牛珀至宝微丸减轻内毒素肺纤维化的机理可能与其对 TGF- β 下游 smads 通路的调节表达相关。

关键词 牛珀至宝微丸 内毒素 肺损伤 肺纤维化 Smads

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是临床上常见的危重性疾病,病死率高达 30%~40%^[1],是各种严重的休克、感染与创伤等所致的急性弥漫性肺泡和肺血管内皮细胞的损伤,严重的表现为急性呼吸窘迫综合征(Acute respiratory distress syndrome, ARDS),其中难以控制的肺纤维化约占其死因的 40%~70%^[2]。而糖皮质激素只对不足 20%的病人有效,且有不少副作用发生^[3]。2003 年发生的 SARS 死亡多数表现为急性呼吸窘迫综合征并发肺纤维化死亡。内毒素(endotoxin, ET)是导致 ALI 的主要致病物质,转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)是促进纤维化的主要因子,而 Smad 家族蛋白是 TGF- β 受体的胞内激酶底物,介导了 TGF- β 对基因表达的调控。我们的前期工作发现牛珀至宝微丸能上调 TGF- β 1 及其受体在急性肺损伤时表达,并能改善并

发的纤维化。考虑是增加了其抑制炎症反应的功能,杜绝了纤维化源头^[4]。为探讨其治疗纤维化的机理,阐明牛珀至宝微丸干预 TGF- β 1 影响胶原蛋白生成的机理是否与调节 TGF- β 1 下游 Smads 蛋白表达相关,为此我们进行了以下实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料 健康普通级 Sprague-Dawley 大鼠 48 只,体重 170~220g,雌雄不限,雌鼠无孕,由广州中医药大学实验动物中心提供。脂多糖(Lipopolysaccharide LPS, serotype O55:B5),为 Sigma 公司产品, L2880, 10mg/支。地塞米松磷酸钠粉剂, Sigma 产品, 100mg;羟脯氨酸碱水解法试剂盒由南京建成生物工程研究所提供(批号:20060726);兔源大鼠单抗 Smads, SABC 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒,由武汉博士德生物工程有限公司提供。牛珀至宝微丸(1g/支)由江西中医学院热病研究室提供(批号:9901)。将微丸溶于水,制备成含生药量 1mg/ml 的口服液。

1.2 动物分组及处理措施 SD 大鼠随机分成正常(normal)组、LPS 模型组、LPS+地塞米松治疗组、LPS+牛珀至宝微丸治疗组,每组 12 只。LPS 模型组按第一天气管内插管滴注脂多糖内毒素(1.5mg/kg),第

※基金项目 国家自然科学基金项目(No:30572454);广东省中医药管理局项目(No:2050055)

*作者简介 张蓉,女,硕士研究生,专业为中西医临床老年病学。通讯作者:杜少辉,男,医学博士,教授,主任医师,研究员。主要研究方向:老年病。

•作者单位 1.广州中医药大学附属深圳医院内科(广东深圳 518033);2.广州中医药大学(510405)

二天腹腔注射脂多糖内毒素(3.0mg/kg),第三天气管内插管滴注脂多糖内毒素(3.0mg/kg),造成内毒素肺纤维化模型;与此同时,造模后激素治疗组腹腔注射地塞米松(3.0mg/kg)每天一次给药7天;中药治疗组根据成人日服药量折算成大鼠灌胃剂量,牛珀至宝微丸剂量为50mg/100g每天两次,造模前3天及造模后7天给药;正常对照组则给予等体积蒸馏水灌胃,连续7天。各组动物分别于造模后1、3、7、9、14、21、28天时间点处死取材。

切片制备:大鼠开腹、胸腔,经左心至升主动脉插管,先用生理盐水(37℃)150 ml 冲去血管中血液,继而灌注4%多聚甲醛的0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PBS, PH=7.4)350ml,注毕立即取肺置于相同的新鲜灌注液中固定至组织块沉底,洗去表面的固定液再取材,继之梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,石蜡切片,片厚10um。

1.3 HE染色步骤 石蜡切片脱蜡水化2min,苏木素液染色3min,双蒸水洗3~5min,5%~1%盐酸酒精分化数秒钟,双蒸水洗3~5min,弱碱性溶液7min,双蒸水冲洗,伊红复染2min,脱水透明,树脂封片。

1.4 Van Gieson 法染色步骤 石蜡切片脱蜡水化2min,用Weigert铁苏木素液染5~10 min,流水洗数分钟,1%盐酸乙醇分化,自来水洗至蓝化,再蒸馏水洗。用Van Gieson液染1~5min,倾去染液,直接用95%乙醇分化和脱水。无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。光镜下观察可见胶原纤维呈红色,肌纤维、胞质及红细胞呈黄色,细胞核呈蓝褐色。

1.5 免疫组化染色步骤 载玻片脱片剂处理选择APES或Poly-L-Lysine。捞片后置烤箱60℃30~60min以使切片紧密黏附。继之切片脱蜡、梯度水化。双蒸水新鲜配置3% H₂O₂,室温10min以灭活内源性酶。双蒸水洗2min×3次。滴加酶消化液,室温10min,微波中火2min,双蒸水洗2min×3次。滴加抗原修复液,室温10min,微波中火2min,双蒸水洗2min×3次。滴加正常山羊血清封闭液,室温20min,甩去多余液体,不洗。滴加兔源鼠抗 smads(事先配制合适的抗体滴度,对照和阴性对照滴加0.01MPBS或正常山羊血清替代)37℃孵育1~2h或4℃过夜,0.01M PBS洗2min×3次。滴加二抗生化学化山羊抗兔 IgG37℃孵育20min,0.01M PBS洗2min×3次。滴加SABC 37℃孵育20min,0.01M PBS洗5min×4次。新鲜配制的DAB显色,使用DAB显色试剂盒(ED1022)。室温显色,镜下控制反应时间。双蒸水

洗,苏木素复染1min,时间按所需着色的强度而定,双蒸水洗2min×3次。梯度酒精脱水、透明干燥,封片。显微镜观察,每张切片随机选取10个高倍视野计算其中阳性细胞数和总细胞数,求百分比分析结果。

1.6 免疫荧光染色步骤 继免疫组化加一抗步骤后改加稀释后荧光抗体,37℃孵育30min;0.01M PBS液3×2'冲洗;双蒸水洗,凉干;加甘油缓冲液,封片、镜检。结果显示荧光显微镜所观察到的图象,主要以两个指标判断结果,一个是形态学特征;另一个是荧光的亮度,在结果的判定中,二者结合综合判定。

1.7 Smads Western 印迹检测步骤 应用组织裂解液分别裂解肺组织,提取总蛋白,按照蛋白定量试剂盒(美国Bio-Rad公司产品)的说明测定组织提取液的蛋白浓度。每例标本取蛋白100mg,经10%SDSPAGE分离,然后蛋白质被电转移到硝酸纤维素膜上。用含50g/L脱脂牛奶的TTBS封闭。Smads表达量及磷酸化程度的检测用各自单克隆抗体及其相应磷酸化的单克隆抗体作一抗(工作浓度均为1:1000),辣根过氧化物酶(HRP)偶联的羊抗兔 IgG 作为二抗,室温反应2小时。最后曝光:用TTBS洗3次,滴加发光液,用保鲜膜包裹,用X光片在增感屏中紧密接触,使X光片感光显影,定影拍照,扫描。

1.8 统计学分析 所得数据用SPSS11.5统计软件进行处理,均数间两两比较采用t检验,实验数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 HE染色结果 正常组细支气管周围偶有炎细胞浸润,肺泡完整正常。模型组肺泡腔内有炎性渗出物,大量炎细胞浸润,细支气管收缩闭锁,肺间质增厚,肺泡壁毛细血管扩张充血,肺泡腔及支气管周围可见红细胞渗出,腔内有微血栓形成,肺泡结构破坏。激素组炎症渗出明显减少,肺间质增厚,结构紊乱;牛丸组水肿减轻,肺泡腔内有炎性渗出物,炎细胞浸润,渗出较激素组稍增多但肺间质基本正常,肺泡完整,与模型组对照有明显改善。

2.2 组织的 Van Gieson 法染色结果 与Normal组相比,模型组胶原纤维表达明显,9天时血管壁、支气管壁和肺泡隔可见红色胶原纤维表达显著,肺泡隔以红色的胶原纤维相连,血管壁与支气管壁的内皮下与肌层下均有胶原纤维表达。治疗组胶原纤维表达相对模型组减轻,地塞米松组减轻不明显,牛丸组后期(28天组)可见肌层下血管壁与支气管壁的少量胶

原纤维表达,内皮下的胶原纤维表达显著减少,肺泡隔阳性不明显。

2.3 各组不同时间点肺组织中 Smads 的免疫染色结果 正常肺组织中较大血管内皮细胞及平滑肌细胞胞浆中存在 Smad2/3、Smad4、Smad7 蛋白弱阳性表达,Smad4 在支气管上皮细胞胞浆也有阳性表达,磷酸化 Smad2/3 与 Smad7 呈负相关。smad2/3:LPS 组 7 天、9 天时在部分肺泡上皮细胞和成纤维细胞/巨噬细胞胞核出现强阳性表达,尤 9 天最显著;LPS + DEX 组表达明显减弱,中药牛丸组后期起阻断作用稳定在较低水平。Smad4:起协同作用,LPS 组 14 天阳性表达高峰,其阳性表达出现在部分肺泡上皮、巨噬细胞、间质成纤维/纤维细胞胞核;治疗组较模型组表达增强。Smad7:LPS 组在肺泡上皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞、支气管上皮细胞中始终见极低表达,LPS + DEX 后期表达减弱,中药牛丸组前期 7 天时即可在各细胞中见强阳性表达,28 天时表达最强。提示内毒素肺损伤纤维化修复呈双峰性,牛丸可提高损伤组织的负反馈表达。

2.4 Western blotting 结果 Smad2/3 LPS 组表达持续增强,9 天表达最强,这与免组相符;牛丸组后期有效。Smad4 LPS 组 9 - 14 天表达较强,初期表达较弱;LPS + DEX 组表达较模型组强;而牛丸组表达逐渐增强。Smad7 LPS 组早期表达即十分低下,也许这与 LPS 早期即出现纤维化相关;LPS + DEX 组无意义,牛丸组早期表达显著增高。

3 讨论

急性肺损伤所致的纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是 LPS 通过刺激体内多种细胞,合成和释放各种细胞因子,再通过旁分泌或体循环作用于其他组织细胞,引起全身炎症反应综合征;肺部炎症导致肺泡持续性损伤及细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)产生细胞反复破坏、修复、重建及过度沉积的过程,是机体组织遭受损伤后的过度修复反应^[5-6]。TGF- β_1 介导其下游信号通路的在纤维化中起重要作用,TGF- β_1 激活后,与细胞表面 T β R II、T β RI 结合,通过 Smads 等转录因子启动细胞外信息传递。Smads 蛋白家族是 TGF- β 超家族受体的直接作用底物,也是将受体信号传导到核内的介质,其他途径对纤维化的影响也与此通路密切相关^[7]。其家族成员可分为三类,第 1 类是受体调节 Smads (R - Smads),属正调节信号,其中 Smads2、3 是 TGF- β_1 主要通路;第 2 类是协同 Smad

(Co - Smad),即 Smad4;第 3 类是拮抗 Smads (I - Smads),属负调节信号,主要有 Smads6、Smads7,拮抗 Smads 通过其反馈调节作用抑制 R - Smads 的活化或促进 TGF- β 受体的降解对抗 TGF- β 的作用,TGF- β_1 主要受 Smads7 抑制。

陈颖伟等^[8]在体外培养的小鼠胚胎肺组织中,外源的 TGF- β 可明显抑制肺上皮细胞分级形成,下调表面活性蛋白 c 基因表达。利用重组腺病毒转染 Smad7 基因后,上述作用明显减轻,提示 Smad7 可调整肺发育、损伤和修复过程中异常的 TGF- β 信号转导途径。Zhao 等^[9]应用反义技术特异性地阻断体外培养的小鼠肺组织中内源性的 Smad7 表达后发现,Smad7 的反义寡核苷酸可促进 TGF- β 对肺上皮细胞发育的抑制作用,抑制 IFN- γ 和 TNF- α ,磷酸化的 Smad2/3 相应增强。过量的 Smad7 阻断信号以支持致炎(炎症前)细胞因子的兴奋,Smad7 表达沉默修复 TGF- β 抑制炎症的能力^[10]。Nakao 等^[11]用博来霉素诱发小鼠肺纤维化后,在支气管内直接注射携带 Smad7 基因的重组腺病毒,以观察 Smad7 对肺纤维化的影响。结果表明,小鼠肺组织中 Smad7 基因的瞬时转染和表达可阻断 Smad2 的磷酸化进程,抑制 I 型前胶原 mRNA 的表达,降低肺组织羟脯氨酸含量,改善肺组织纤维化程度。在本研究中牛丸组 Smads7 过度表达能对抗 TGF- β_1 信号,使纤维化得以改善。

牛珀至宝微丸是根据清·何廉臣《重订广温热论》所载犀珀至宝丹而化裁,本方是在中医“三宝”之一的至宝丹基础上增加了通瘀开窍、辟秽化浊的功能,并且为了使其更有利于体内吸收,本课题组将其改为微丸剂型。何氏称“此丹大剂通瘀直达心窍,又能上清脑络,下降浊阴,专治一切时邪内陷血分,瘀塞心房,不省人事”。前期研究表明对感染性休克的内厥外脱证及内毒素休克所致的多脏器损伤有较好的疗效,并能影响胶原纤维的表达^[12]。前期研究又表明牛珀至宝微丸能下调内毒素所致的蛋白激酶 C 信号通路表达,而此又是正调节 Smads2、3 的因子^[13],因此,可以推理牛珀至宝微丸可能通过蛋白激酶 C 减弱 TGF- β_1 下游的正调节信号 Smads 表达,并且还可能增强了负调节信号表达。可见牛珀至宝微丸完全不同于 TGF- β_1 拮抗治疗,其治疗纤维化有其独特机理。本实验 TGF- β 介导的肺纤维化证实可为 Smad2/3 激活,而为 Smad7 所阻断,通过抑制 Smad2/3 及提高 Smad7 的表达以阻断 TGF- β 信号转导途径可能为治疗肺纤维化的一种手段。

令人兴奋的是,中医药为解决此难题提供了思路。本课题组观察到牛珀至宝微丸上调 TGF- β 的表达时,对急性肺损伤纤维化有治疗作用,牛珀至宝微丸又是如何干预 TGF- β 影响胶原蛋白生成的呢?这就不得不从 TGF- β 的信号转导通路介导的生物学效应考虑。TGF- β 激活后,与细胞表面 TGF- β 受体 I、II (T β RI、T β RII) 结合,通过 Smads 等转录因子启动细胞外信息传递。Smads 蛋白家族是 TGF- β 的超家族受体的直接作用底物,也是将受体信号传导到核内的介质[18]。通路系统虽然简单,但其存在一个比较精细的控制其输入与输出的网络,其家族成员可分为3类,第1类是受体调节 Smad (R-Smad),包括 Smad-1、2、3、5 和 8, Smads2、3 是 TGF- β 主要通路。TGF- β 在细胞外与 T β RIII 结合后,把 TGF- β 传递给 T β R II 或者 TGF- β 直接与 T β R II 结合,T β R II 型受体一旦与 TGF- β 结合,则导致 T β RI 聚集,形成异侧复合物,同时使 T β RI 蛋白激酶磷酸化,激活 T β RI。活性 T β RI 直接与 Smads2、3 发生短暂相互作用,使 Smads2、3 磷酸化。第2类是协同 Smad (C-Smad),即 Smad4,活化的 R-Smad 与 C-Smad 形成异寡聚体,转移至细胞核,调节靶基因表达,如能与胶原酶基因启动子 AP-1 结合位点结合。第3类是拮抗 Smads,主要有 Smads6、Smads7, TGF- β 主要受 Smads7 抑制,通过阻断受体激活 R-Smads,抑制其它两类底物的信号转导,国外有学者已证实小鼠博莱霉素模型中 Smads7 过度表达能对抗 TGF- β 信号,使纤维化得以改善^[18]。Smads 通路不但受到本系统的负反馈调节,机体还可通过 Smad 降解来调节其信号,如 Smurf 介导的泛素-蛋白酶体途径可下调磷酸化 Smads2 水平;Smads 蛋白异聚体进入核内不但受转录激活因子影响,还受转录抑制因子调节,目前公认的抑制因子有 c-Ski, SnoN, SNIP1、E1A、TGIF 等。我们在既往的研究工作中发现:牛珀至宝微丸能下调内毒素所致的蛋白激酶 C 信号通路表达,而此又是正调节 Smads2、3 的因子^[20],因此,可以设想牛珀至宝微丸能通过蛋白激酶 C 下调 TGF- β 胞内信号 Smads 转导,即有可能降低正调节信号,增强负调节信号。

牛珀至宝微丸就是通过这样的机理,当内毒素组胶原纤维表达显著增强,牛珀至宝微丸有减少胶原纤维表达的作用,同时可使肺损伤修复,牛珀至宝微丸能促进 TGF- β_1 在急性肺损伤时表达增加。一方面发挥 TGF- β_1 的抑制炎症反应作用杜绝肺纤维化的病源,另一方面降低 TGF- β_1 下游正调节信号 smad2/3,

提高负调节信号 smad7 以减轻肺纤维化,为临床运用牛珀至宝微丸治疗急性肺损伤纤维化疾病提供实验基础。

参考文献

- [1] Michael AM, Guy AZ, Charles E, et al. Future research directions in acute lung injury: summary of a national heart, lung, and blood institute working group [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 16: 1027-1035.
- [2] Marshall R, Bellin G, Laurent G. The acute respiratory distress syndrome: fibrosis in the fast lane. *Thorax*, 1998, 53: 815-817.
- [3] Armstrong L, Thickett DR, Mansell JP, et al. Changes in collagen turnover in early acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160: 1910-1915.
- [4] 杜少辉,徐志伟,陈东风,等.牛珀至宝微丸对内毒素休克大鼠肺损伤转化生长因子- β_1 及其受体表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2004, 24(7): 37-39.
- [5] 张悦,杜少辉,周大桥,等.蛋白激酶 C 对内毒素休克大鼠肝损伤 iNOS 表达的调控[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2003, 9(6): 377-379.
- [6] 李伊为,邓汝东,陈东风,等.牛珀至宝微丸对内毒素休克肾组织 iNOS 表达的影响[J]. *解剖学研究*, 2003, 25(1): 13-15.
- [7] Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins [J]. *Nature*, 1997, 389(6651): 631-635.
- [8] 陈颖伟,李定国. smad7 和组织器官纤维化[J]. *上海第二医科大学学报*, 2005, (2): 131-133.
- [9] Zhao J, Shi W, Wang YL, Chen H, Bringas Jr P, Datto MB, et al. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, 282: 585-593.
- [10] Claudio Fiocchi. TGF- β /Smad signaling defects in inflammatory bowel disease: mechanisms and possible novel therapies for chronic inflammation. *J Clin. Invest*, 2001; 108: 523-526.
- [11] Nakao A, Fujii M, Matsumura R, et al. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest*, 1999; 104(1): 5-11.
- [12] 黎辉,李春,杜少辉,等.牛珀至宝微丸影响内毒素休克大鼠急性肺损伤胶原纤维的表达[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2005, 26(2): 156-157.
- [13] Ithor YM, Peter TD, Carl HH, et al. Regulation of Smad signaling by protein kinase. *C. FASEB*. 2001, 15(3): 553-555.
- [14] 魏志军,杜少辉,黄洁,等.牛珀至宝微丸对蛋白激酶 C 调控 LPS 诱导 iNOS 基因表达的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2002, 9(6): 334-337.
- [15] 杜少辉,周大桥,张悦,等.牛珀至宝微丸对内毒素休克蛋白激酶 C 调控 NO 生成的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2002, 9(4): 189-193.
- [16] 黎辉,杜少辉,李伊为,等.牛珀至宝微丸对内毒素休克大鼠肺组织 NOS 表达的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2002, 19(4): 305-308.

(下转第 66 页)

- 关系的实验观察[J]. 四川中医,1996,9(6):3-4.
- [6]王崇行. 高血压心气虚血瘀型病理生理学基础及气功治疗[J]. 中国中西医结合杂志,1995,15(8):454.
- [7]李运伦,姚晓渝. 补肾方对老年人高血压的影响[J]. 中国医药学报,1999,14(5):26-28.
- [8]王 钢,陈以平,邹燕勤. 现代中医肾脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:3.
- [9]郑 林,戴小华,杨 帆. 养肝益水颗粒防治高血压病早期肾损害理论探讨[J]. 中国中医急症,2007,16(4):439-440.
- [10]范群丽,赵东杰,唐蜀华. 降压益肾颗粒治疗高血压病早期肾损害临床观察[J]. 南京中医药大学学报,2003,19(5):8-9.
- [11]仲 邑,王 钢,倪 斌. 从脾胃认识高血压肾损害的发展演变规律[J]. 天津中医,2005,22(4):111-113.
- [12]梅伯锐,罗致强,罗素珍. 辨证运用“眩晕七丹汤”治疗老年瘀性眩晕[J]. 广州中医药大学学报,1993,10(2):61-63.
- [13]方力行,张本坤,钱爱珠,等. 高肇基辨治高血压病学术思想及电脑系统医理设计[J]. 上海中医药杂志,1992,(3):6-8.
- [14]何有为. 益肾活血法治疗高血压肾损害临床观察[J]. 湖北中医杂志,2007,29(5):32-33.
- [15]徐 宏,赵先锋,杨晓敏. 关建国治疗高血压早期肾损害的经验总结[J]. 四川中医,2007,2007,25(8):8-9.
- [16]胡宗仁,刘龙民,朱喜英. 益肾平肝方治疗原发性高血压早期肾损害的临床疗效[J]. 吉林中医药,2008,28(7):490-491.
- [17]孟 伟. 中西医结合治疗高血压肾损害[J]. 中医研究,2003,16(6):29-30.
- [18]周 婷. 中西药结合高血压早期肾损害临床研究[J]. 四川中医,2007,25(8):8-9.
- [19]程广书. 中西医结合治疗高血压肾损害112例[J]. 中医研究,2003,16(6):29-30.
- [20]张 颖. 简述中西药结合必要性[J]. 中国医药指南,2008,6(4):125.
- [21]徐坤英. 保肾康治疗高血压肾损害的临床观察[J]. 中国现代医药杂志,2005,12(7):75.
- [22]徐应抒等. 化痰承气汤治疗高血压病的临床实验研究[J]. 中国医药学报,4:1989,21-24.
- [23]欧亚龙等. 化痰承气汤治疗眩晕(高血压病)的临床研究[J]. 实用中西医结合杂志,1990,1:26-28.
- [24]王崇行,徐定海,钱岳晨等. 气功对高血压血症患者血浆凝血与纤溶指标变化的影响[J]. 中国中西医结合杂志,1993,13(7):45.
- [25]盛笑梅,孙 伟. 试谈中医内科肾脏病的内涵与外延[J]. 南京中医药大学学报,2005,21(2):87-88.
- [26]北京中医学院. 中医各家学说[M]. 上海:上海科学技术出版社,1984:8.
- [27]邱 红. 远方教授治疗高血压性肾损害经验浅析[J]. 辽宁中医药大学学报,2007,10(2):63-64.
- [28]李 丽,钱海凌,黄 琛. 活血化痰利水法治疗高血压病肾损害的体会[J]. 蛇志,2008,20(1):70-71.
- [29]王 锋. 原发性高血压肾损害的诊疗体会[J]. 中国中医药现代远程教育,2008,6(7):779-780.
- [30]冉兴德. 中华药海[M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社,1993:51.
- [31]马洪伟. 中西药结合使用中的相关问题研究[J]. 中华临床医学研究杂志,2008,14(10):1505-1506.

(上接第60页)

- [17] Frand S, Madlener M, Werner S et al. Transforming growth factors β 1, β 2 and β 3 and their receptors and differentially regulated during normal and impaired wound healing. J Biol Chem,1996,271(17):10188-10193.
- [18] Grande JP. Role of transforming growth factor- β in tissue injury and repair[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1997,241:27-40.
- [19] Li L, Artlett GM, Jitnenes SA, et al. Positive regulation of human alpha(I) collagen promoter activity by transcriptional factor SP1. Gene, 1995,164:229-232.
- [20]姜术震,牛建昭,王继峰,等. 气管内滴注LPS建立大鼠气管纤维化模型的机理研究[J]. 北京中医药大学学报,2006,29(1):27-30.
- [21]李才主编. 器官纤维化基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2003,1-160.
- [22] Ksiazk TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med,2003,348(20):1953-1966.
- [23] Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF- β superfamily. Science,2002,296:1646-1647.
- [24] Phan SH, Gantone JC. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by lipopolysaccharide. Lab Invest 1984, 50(5):587-591.
- [25] Moustakas A, Pardali K, Gaal A, et al. Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. Immunol Lett, 2002;82:85-91.
- [26] Marek A, Brodzicki J, Liberek A, et al. TGF- β in chronic inflammatory conditions—a new diagnostic and prognostic marker [J]. Med Sci Monit 2002;8(7):145-151.
- [27] 徐峥嵘,李胜利,王世鑫,等. 转化生长因子 β 与肺纤维化[J]. 卫生研究,2005,3:82-85.