温阳化浊通络方含药血清对系统性硬化病皮肤成纤维细胞 TGF-β_1/Smad 信号通路的影响

卞　华[1]　吕　芹[2]　黄显章[1]　胡久略[1]　杨　雷[1]　毛秉豫[1]

摘要　目的　探讨温阳化浊通络方含药血清对系统性硬化病(systemic sclerosis, SSc)皮肤成纤维细胞 TGF-β_1/Smad 信号通路的影响。**方法**　将 36 例 SSc 患者按随机数字表分为中药组、西药组和中西药组，每组 12 例，中药组予口服温阳化浊通络方汤剂(每日 1 剂)，西药组予口服青霉胺片(每次 0.125 g，每日 2 次)和醋酸泼尼松片(每次 20 mg，每日 1 次)，中西医组予口服青霉胺片、醋酸泼尼松片及温阳化浊通络方汤剂，治疗 1 个月制备含药血清；另取 10 例未治疗的 SSc 患者血清作为对照组。健康皮肤成纤维细胞来源于 2 例女性整形外科患者上臂外侧健康皮肤组织。各组血清分别加入 SSc 患者和健康皮肤成纤维细胞培养体系中。Western blot 法测定皮肤成纤维细胞转化生长因子-β_1Ⅰ型受体(transforming growth factor β_1 receptor typeⅠ, TGF-β_1RⅠ)、TGF-β_1Ⅱ型受体(TGF-β_1 RⅡ)、p-Smad2/3 及 Smad7 蛋白表达，RT-PCR 法检测 SSc 皮肤成纤维细胞Ⅰ、Ⅲ型胶原(Col-Ⅰ、Col-Ⅲ)mRNA 的表达，ELISA 法测定 SSc 皮肤成纤维细胞培养上清液中 MMP-9 及 TIMP-1 含量。**结果**　与对照组比较，西药组、中药组和中西药组 SSc 患者和健康皮肤成纤维细胞 TGF-β_1 RⅠ、p-Smad2/3 蛋白水平降低，Smad7 蛋白水平升高($P<0.05$, $P<0.01$)，同时中西药组 TGF-β_1 RⅡ蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$)；与西药组比较，中药组和中西药组 TGF-β_1 RⅠ、p-Smad2/3 表达降低，中西药组 Smad7 蛋白表达升高($P<0.01$)。SSc 患者皮肤成纤维细胞中，与对照组比较，西药组、中药组和中西药组 Col-Ⅰ、Col-Ⅲ mRNA 表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)，且中西药组 Col-Ⅲ mRNA 表达水平明显低于西药组($P<0.01$)。与对照组比较，西药组、中药组和中西药组 MMP-9 水平及 MMP-9/TIMP-1 比值明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)，而中药组和中西药组 TIMP-1 表达水平降低($P<0.01$)；与西药组比较，中西药组 MMP-9 水平和 MMP-9/TIMP-1 比值升高，中药组和中西药组 TIMP-1 水平降低(均 $P<0.01$)。**结论**　温阳化浊通络方含药血清可能通过调控 SSc 皮肤成纤维细胞 TGF-β_1/Smad 信号通路中关键分子 TGF-β_1 RⅠ、p-Smad2/3 及 Smad7 的表达，抑制 TGF-β_1/Smad 信号通路传导，减少 Col-Ⅰ、Col-Ⅲ 表达。

关键词　系统性硬化病；温阳化浊通络方；含药血清；成纤维细胞；TGF-β_1/Smad 信号通路

Effects of Wenyang Huazhuo Tongluo Recipe Containing Serum on Transforming Growth Factor β_1/Smad Signaling Pathway of Skin Fibroblasts in Systemic Sclerosis

BIAN Hua[1], LV Qin[2], HUANG Xian-zhang[1], HU Jiu-lue[1], YANG Lei[1], and MAO Bing-yu[1]　*1 Experimental Center, Medical School, Nanyang Institute of Technology, Henan (473004); 2 Department of Rheumatism, Second Affiliated Hospital, Nanyang Medical College, Henan (473061)*

ABSTRACT　Objective　To explore the effects of Wenyang Huazhuo Tongluo Recipe (WYHZTLR) containing serum on transforming growth factor β_1 (TGF-β_1)/Smad signaling pathway of skin fibroblasts in systemic sclerosis (SSc). Methods　Totally 36 SSc patients were randomly assigned to Chinese medicine (CM) group, Western medicine (WM) group, and integrative medicine (IM) group according to random digit table, 12 in each group. Patients in the CM group took WYHZTLR decoction (one dose per day). Patients in the WM group took penicillamine tablet (0.125 g each time, bid) and Prednisone Acetate Tablet (PAT 20 mg, qd). Patients in the IM group took penicillamine, PAT, and WYHZTLR decoction (in the same dosage of corresponding

基金项目：国家自然科学基金资助项目(No. 81373627)；河南省基础与前沿技术计划研究项目(No. 122300410223)
作者单位：1.南阳理工学院医学院实验中心(河南 473004)；2.南阳医学高等专科学校附属第二医院风湿科(河南 473061)
通讯作者：卞　华，Tel：0377－62071311，E-mail：biancrown@163.com
DOI：10.7661/CJIM.2015.09.1054

drugs as aforesaid). All patients were treated for one month to get drug containing serum. Besides, 10 untreated SSc patients' serum was taken as the control group. Healthy subjects' skin fibroblasts were originated from healthy skin tissue of the upper arms of 2 female patients undergoing plastic surgery. Corresponding serum of each group was added in the culture system of SSc patients' and healthy subjects' dermal fibroblasts respectively. Expression levels of TGF-β_1 receptor type Ⅰ (TGF-β_1RⅠ), TGF-β_1 receptor Ⅱ (TGF-β_1RⅡ), p-Smad2/3 and Smad7 protein were examined by Western blot. Expression levels of collagen type Ⅰ and collagen type Ⅲ (Col-Ⅰ, Col-Ⅲ) mRNA were examined by reverse transcription PCR. Contents of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the supernatant of SSc skin fibroblasts were examined by ELISA. Results Compared with the control group, expression levels of TGF-β_1 RⅠ and p-Smad2/3 protein significantly decreased, but expression levels of Smad7 protein significantly increased in skin fibroblasts of SSc patients and healthy subjects of WM, CM, and IM groups ($P<0.05$, $P<0.01$). Meanwhile, the expression level of TGF-β_1 RⅡ decreased in the IM group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the WM group, expression levels of TGF-β_1 RⅠ and p-Smad2/3 protein significantly decreased, but that of Smad7 protein significantly increased in IM groups ($P<0.01$). mRNA expression levels of Col-Ⅰ and Col-Ⅲ in SSc skin fibroblasts significantly decreased more in WM, CM, and IM groups than in the control group ($P<0.05$, $P<0.01$). Besides, the expression level of Col-Ⅲ mRNA was significantly lower in the IM group than in the WM group ($P<0.01$). Compared with the control group, serum levels of MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratios increased more obviously in WM, CM, and IM groups ($P<0.05$, $P<0.01$). But expression levels of TIMP-1 decreased significantly in CM and IM groups ($P<0.01$). Expression levels of MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratios increased more in the IM group than in the WM group ($P<0.01$). Expression levels of TIMP-1 decreased more in CM and IM groups than in the WM group ($P<0.01$). Conclusion WYHZTLR containing serum could reduce expression levels of Col-Ⅰ and Col-Ⅲ possibly through regulating key signal molecules, such as TGF-β_1 RⅠ, p-Smad2/3, and Smad7 in TGF-β_1/Smad signaling pathway of SSc skin fibroblasts, and inhibiting transduction of TGF-β_1/Smad signaling pathway.

KEYWORDS systemic sclerosis; Wenyang Huazhuo Tongluo Recipe; drug containing serum; fibroblast; transforming growth factor β_1/Smad signaling pathway

系统性硬化病(systemic sclerosis, SSc)是以胶原等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积为特征的自身免疫性疾病,至今病因未明,西药治疗效果欠佳。前期研究表明,温阳化浊通络方治疗SSc具有较好疗效[1],同时温阳化浊通络方能阻止SSc患者皮肤成纤维细胞周期由G_1期进入S期,进而控制细胞分裂,抑制其增殖[2]。本研究运用血清药理学方法,观察温阳化浊通络方含药血清对SSc患者皮肤成纤维细胞转化生长因子-β_1(transforming growth factor β_1, TGF-β_1)/Smad信号通路的影响,进一步探讨其拮抗SSc纤维化的可能作用机制。

资料与方法

1 诊断标准 SSc诊断标准参照1980年美国风湿病学会制定的SSc分类标准[3],中医辨证分型标准参照《中药新药临床研究指导原则》[4]中阳气亏虚,浊邪阻络证辨证标准。

2 纳入标准 (1)符合SSc诊断标准及中医辨证分型标准;(2)病程≤2年;(3)年龄18~60岁;(4)患者签署知情同意书。

3 排除标准 (1)皮肤严重萎缩、硬化者;(2)合并心、肺、肾、造血系统等严重疾病者;(3)合并其他风湿病者;(4)妊娠或哺乳期女性;(5)精神病者。

4 一般资料 36例均为2012年6月—2013年3月南阳理工学院附属第一医院和南阳医学高等专科学校附属第二医院门诊SSc患者,按随机数字表法分为西药组、中药组和中西药组,每组12例。西药组女性9例,男性3例;年龄30~49岁,平均(38.62±10.31)岁,病程5周~24个月,平均(12.68±8.69)个月。中药组女性9例,男性3例,年龄32~51岁,平均(39.79±12.05)岁;病程4周~22个月,平均(13.98±8.83)个月。中西药组女性10例,男性2例,年龄30~50岁,平均(39.01±9.97)岁;病程3周~23个月,平均(12.73±9.25)个月。3组患者在性别、年龄、病程方面差异均无统计学意义($P>0.05$)。另取10例未治疗的SSc患者作对照组,其中女性8例,男性

2 例,年龄 31 ~50 岁,平均(39.58 ±11.37)岁;病程 2 周~3 个月,平均(1.03 ±1.28)个月。此研究方案经南阳理工学院伦理委员会批准。

5　治疗方法　西药组予青霉胺片(0.125 g/片,上海信谊药厂有限公司,批号:052130401),每次 0.125 g,每日 2 次;醋酸泼尼松片(5 mg/片,浙江仙琚制药股份有限公司,生产批号:110810),每次 20 mg,每日 1 次。中药组予温阳化浊通络方(由黄芪 30 g　党参 15 g　山药 12 g　桂枝 9 g　淫羊藿 12 g　积雪草 15 g　白芥子 9 g　丝瓜络 12 g　槲果藤 12 g　熟地 15 g 组成,医院药剂科制备,提取至 200 mL/剂)煎剂口服,每日 1 剂,早晚分服。中西药组在中药基础上加服西药,药物用法同前。3 组疗程均为 1 个月。对照组于服药前先采静脉血,分离血清后,0.22 μm 滤器过滤除菌,-80 ℃保存备用。用药 3 组经治疗 1 个月后,亦采静脉血,处理同上,以制备含药血清。

6　观察指标及方法

6.1　皮肤成纤维细胞培养及鉴定　在局麻及无菌条件下,分别切取 5 例病程 <2 年的进展期 SSc 患者前臂活动性硬化边缘皮肤和 2 例女性整形外科患者上臂外侧健康皮肤组织。采用组织块培养法原代培养成纤维细胞[5],倒置相差显微镜下进行细胞形态学鉴定,并对第 2 代细胞分别以角蛋白和波形蛋白单克隆抗体进行免疫组化鉴定。3 ~6 代细胞用于实验,多余细胞放液氮中冻存备用。

6.2　TGF-β_1 受体 1 抗体(TGF-β_1 RⅠ)、TGF-β_1 RⅡ、p-Smad2/3 及 Smad7 蛋白水平　采用 Western blot 检测法。取对数生长期 SSc 患者和健康人皮肤成纤维细胞分别接种于 6 孔培养板,每孔含 5×10^5 个细胞。待细胞贴壁后,置入无血清 DMEM 培养基,继续培养 24 h。然后分别加入 20% 的对照组和各处理组含药血清,每组设 6 个复孔。37 ℃、5% CO_2 孵箱培养 72 h。将收集的成纤维细胞加入蛋白裂解液裂解,冰浴 30 min。4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min,收集上清,用 BCA 蛋白检测试剂盒进行蛋白定量,-70 ℃保存。常规方法进行 20% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至 PVDF 膜。按 0.1 mL/cm^2 加入封闭液,室温封闭 2 h 后,依次加入一抗(1∶1 000 稀释),室温下轻摇 2 h,4 ℃孵育过夜。弃去反应液,用 TBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 10 min;加入二抗(1∶2 000 稀释),37 ℃孵育 1 h,用 TBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 10 min。ECL 发光试剂对硝酸纤维素膜进行显色反应,用电泳凝胶成像系统成像并对免疫印迹条带进行半定量分析,用 β-肌动蛋白(β-actin)作内参照,以与 β-actin 的比值表示各组蛋白表达水平。

6.3　Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白(Col-Ⅰ、Col-Ⅲ)mRNA 表达　采用 RT-PCR 检测法。Trizol 试剂一步法提取 SSc 皮肤成纤维细胞总 RNA。逆转合成 cDNA 后,取模板 cDNA 进行 PCR 扩增。引物由北京赛百盛生物工程公司设计合成,序列分别为:Col-Ⅰ:5′-GTGGTGGTTATGACTTTGGT-3′,下游 5′-CAGTTCTTGGCTGGGATG-3′,扩增长度 334 bp;Col-Ⅲ:上游 5′-GGTCAGCCTGGTGTCATG-3′,下游 5′-AAGCCTTGTAATCCTTGTG-3′,扩增长度 212 bp;β-actin:上游 5′-CCTGAGAGCATTTGCGGTGG-3′,下游 5′-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3′,扩增长度 416 bp。PCR 扩增条件:94 ℃变性 5 min,94 ℃ 30 s,退火 30 s(Col-Ⅰ、Col-Ⅲ、β-actin 退火温度分别为:53 ℃、54 ℃、55 ℃);72 ℃ 30 s;35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。上述 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳约 30 min 后,然后以凝胶成像仪紫外光下拍照,Quantity One 图像分析软件进行光密度分析,分别计算 Col-Ⅰ、Col-Ⅲ mRNA 与内参 β-actin 的灰度比值,得出相对表达量。

6.4　培养上清液中 MMP-9 和 TIMP-1 含量　收集各组 SSc 皮肤成纤维细胞培养上清液,采用 ELISA 方法检测 MMP-9、TIMP-1 含量,具体步骤按试剂盒说明书进行,在酶标仪 450 nm 波长处读数。

7　统计学方法　采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1　各组 SSc 皮肤成纤维细胞 TGF-β_1 RⅠ、TGF-β_1 RⅡ、p-Smad2/3 及 Smad7 蛋白表达比较(表 1,图 1)　与对照组比较,西药组、中药组、中西药组 TGF-β_1 RⅠ、p-Smad2/3 表达水平降低($P<0.05$,$P<0.01$),Smad7 表达水平升高($P<0.01$),同时中西药组 TGFβ$_1$ RⅡ水平也明显降低($P<0.05$);与西药组比较,中药组、中西药组 TGF-β_1 RⅠ、p-Smad2/3 表达降低,中西药组 Smad7 表达升高($P<0.01$)。

2　各组健康皮肤成纤维细胞 TGF-β_1 RⅠ、TGF-β_1 RⅡ、p-Smad2/3 及 Smad7 蛋白表达比较(表 2,图 2)　与对照组比较,西药组、中药组和中西药组 TGF-β_1 RⅠ和 p-Smad2/3 表达降低,Smad7 表达升高($P<0.05$,$P<0.01$),同时中药组和中西药组 TGFβ$_1$ RⅡ表达亦明显降低($P<0.01$);与西药组比较,中药组、中西药组 TGF-β_1 RⅠ、TGF-β_1 RⅡ及 p-Smad2/3 表达降低,中西药组 Smad7 表达升高(均 $P<0.01$)。

表 1 各组 SSc 皮肤成纤维细胞 TGF-β_1 RⅠ、TGF-β_1 RⅡ、p-Smad2/3 及 Smad7 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

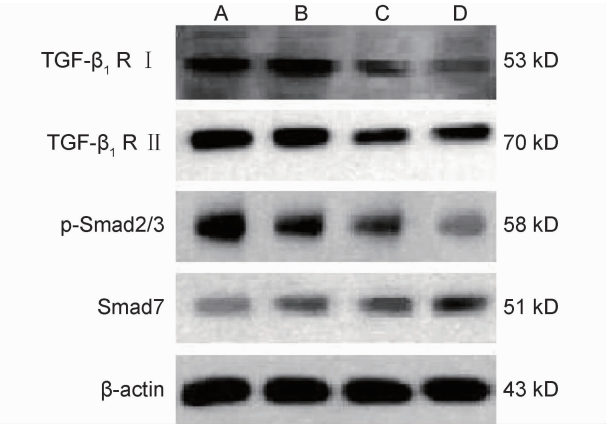
组别	n	TGF-β_1 RⅠ	TGF-β_1 RⅡ	p-Smad2/3	Smad7
对照	6	0.872 ± 0.057	0.793 ± 0.037	0.873 ± 0.039	0.355 ± 0.035
西药	6	0.848 ± 0.050 *	0.768 ± 0.042	0.823 ± 0.045 *	0.523 ± 0.038 **
中药	6	0.543 ± 0.045 **△	0.750 ± 0.038	0.618 ± 0.031 **△	0.547 ± 0.036 **
中西药	6	0.428 ± 0.034 **△	0.733 ± 0.031 *	0.328 ± 0.029 **△	0.608 ± 0.043 **△

注：与对照组比较，*P < 0.05，**P < 0.01；与西药组比较，△P < 0.01

表 2 各组健康皮肤成纤维细胞 TGF-β_1 RⅠ、TGF-β_1 RⅡ、p-Smad2/3 及 Smad7 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

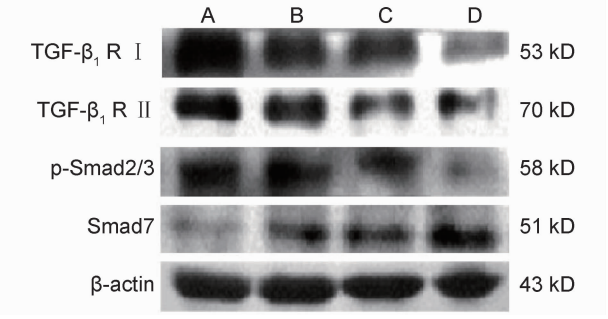
组别	n	TGF-β_1 RⅠ	TGF-β_1 RⅡ	p-Smad2/3	Smad7
对照	6	0.916 ± 0.056	0.823 ± 0.038	0.893 ± 0.039	0.341 ± 0.031
西药	6	0.842 ± 0.492 *	0.800 ± 0.042	0.835 ± 0.040 *	0.493 ± 0.036 **
中药	6	0.713 ± 0.081 **△	0.698 ± 0.039 **△	0.658 ± 0.036 **△	0.517 ± 0.037 **
中西药	6	0.408 ± 0.031 **△	0.592 ± 0.029 **△	0.360 ± 0.032 **△	0.622 ± 0.044 **△

注：与对照组比较，*P < 0.05，**P < 0.01；与西药组比较，△P < 0.01



注：A 为对照组；B 为西药组；C 为中药组；D 为中西药组

图 1 各组 SSc 皮肤成纤维细胞 TGF-β_1 RⅠ、TGF-β_1 RⅡ、p-Smad2/3 及 Smad7 蛋白表达比较



注：A 为对照组；B 为西药组；C 为中药组；D 为中西药组

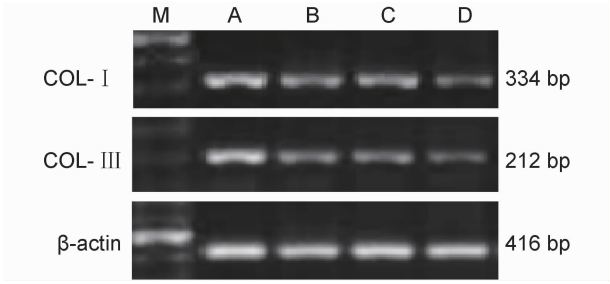
图 2 各组健康皮肤成纤维细胞 TGF-β_1 RⅠ、TGF-β_1 RⅡ、p-Smad2/3 及 Smad7 蛋白表达比较

3 各组 SSc 皮肤成纤维细胞 Col-Ⅰ、Col-Ⅲ mRNA 表达水平比较（表 3，图 3） 与对照组比较，西药组、中药组和中西药组 Col-Ⅰ、Col-Ⅲ mRNA 表达量明显减少（P < 0.05，P < 0.01）；与西药组比较，中西药组 Col-Ⅲ mRNA 降低更明显（P < 0.01）。

表 3 各组 SSc 皮肤成纤维细胞 Col-Ⅰ、Col-Ⅲ mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Col-Ⅰ	Col-Ⅲ
对照	6	0.768 ± 0.025	0.801 ± 0.029
西药	6	0.473 ± 0.018 **	0.553 ± 0.021 **
中药	6	0.695 ± 0.023 *	0.597 ± 0.019 **
中西药	6	0.476 ± 0.017 **	0.238 ± 0.013 **△

注：与对照组比较，*P < 0.05，**P < 0.01；与西药组比较，△P < 0.01



注：M 为 DNA Marker；A 为对照组；B 为西药组；C 为中药组；D 为中西药组

图 3 各组 SSc 皮肤成纤维细胞 Col-Ⅰ及 Col-Ⅲ mRNA 表达比较

4 各组 SSc 皮肤成纤维细胞培养上清液中 MMP-9 和 TIMP-1 水平比较（表 4） 与对照组比较，西药组、中药组、中西药组 MMP-9 水平及 MMP-9/TIMP-1 比值明显升高（P < 0.05，P < 0.01），同时中药组、中西药组 TIMP-1 表达水平降低（P < 0.01）；与西药组比较，中西药组 MMP-9 水平及 MMP-9/TIMP-1 比值升高，而中药组和中西药组 TIMP-1 水平均明显降低（P < 0.01）。

表 4　各组 SSc 皮肤成纤维细胞培养上清液中 MMP-9 和 TIMP-1 水平比较　（ng/mL，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	MMP-9	TIMP-1	MMP-9/TIMP-1
对照	6	66.15 ±3.51	42.00 ±1.66	1.58 ±0.08
西药	6	72.52 ±3.14 *	39.29 ±3.07	1.86 ±0.17 *
中药	6	72.15 ±4.80 *	34.23 ±2.84 * * △	2.13 ±0.26 *
中西药	6	88.38 ±4.22 * * △	28.67 ±2.70 * * △	3.11 ±0.31 * * △

注：与对照组比较，* $P < 0.05$，* * $P < 0.01$；与西药组比较，△ $P < 0.01$

讨　论

成纤维细胞的异常激活并转化为成肌纤维细胞是纤维化形成初始的中心环节[6]。TGF-β 作为重要的促纤维化细胞因子，可直接促进成纤维细胞的增殖，诱导成纤维细胞对胶原等 ECM 的基因转录及蛋白合成增加，并抑制 ECM 分解酶合成及其活性[7]。TGF-β_1 主要通过 Smad 信号通路而产生致纤维化效应。有研究表明，在 SSc 发病机制中存在 TGF-β_1/Smad 信号异常，SSc 患者皮损组织、体外培养的 SSc 成纤维细胞及硬皮病动物模型均表现为 TGF-β_1、TGF-β_1 受体、p-Smad2/3 的表达上调和 Smad7 的明显不足[8-10]。同时 SSc 成纤维细胞的表型特征与被 TGF-β_1 激活的正常成纤维细胞的变化非常相似。因此，抑制 TGF-β_1 的产生和（或）活性，拮抗或阻断 TGF-β_1/Smads 信号通路传导，可以在 SSc 纤维化治疗中发挥重要作用[11]。

温阳化浊通络方是根据中医学肺脾肾—皮毛相关等理论，以黄芪桂枝五物汤、补肺汤等为基础创制而成，具有补肺健脾益肾、化浊通络之功效，临床上针对 SSc 患者的不同中医证型，有一定疗效[1,12]。前期研究表明，温阳化浊通络方含药血清能抑制 SSc 患者皮肤成纤维细胞 TGF-β_1 的分泌，但对 TGF-β_1/Smad 通路下游信号分子的表达是否有影响还不清楚[13]。本研究结果表明，温阳化浊通络方含药血清能够减少 SSc 皮肤成纤维细胞 TGF-β_1 RⅠ、p-Smad2/3 的表达，增加 Smad7 蛋白表达，同时降低 Col-Ⅰ、Col-Ⅲ mRNA 的表达水平。提示温阳化浊通络方含药血清可调整 TGF-β_1 受体水平，直接抑制 Smad2/3 磷酸化，同时激活 TGF-β_1/Smad 信号通路中的负反馈调节系统，进而阻止 SSc 皮肤成纤维细胞 TGF-β_1/Smad 信号转导通路的过度激活状态，抑制胶原的合成。同时本实验结果还表明，在体外温阳化浊通络方含药血清对健康皮肤成纤维细胞 TGF-β_1/Smad 信号通路也具有调控作用，说明温阳化浊通络方不是特异性地作用于 SSc 患者皮肤成纤维细胞，但在体内对健康皮肤成纤维的作用需要进一步探索。

研究表明，TGF-β_1/Smad 信号通路能够通过对 MMPs 和 TIMPs 家族成员因细胞类型而异的基因表达调控作用，表现出调节 ECM 重建的生物学效应[14]。MMPs 家族是 ECM 降解的主要介质，TIMPs 是 MMPs 的天然特异性抑制剂，其中 TIMP-1 可抑制 MMP-9 的降解 ECM 作用。因此，不论 MMP-9 表达降低，还是 TIMP-1 表达增高，均可使 MMP-9/TIMP-1 比值降低，ECM 降解减少，从而导致 SSc 纤维化的形成[15]。本研究发现，温阳化浊通络方含药血清能增强 SSc 患者皮肤成纤维细胞 MMP-9 分泌，抑制 TIMP-1 产生，调节 MMP-9/TIMP-1 失衡，这可能直接与抑制 TGF-β_1/Smad 信号转导通路有关。

综上所述，温阳化浊通络方可能通过调控 SSc 皮肤成纤维细胞 TGF-β_1/Smad 信号通路中关键分子 TGF-β_1 RⅠ、p-Smad2/3、Smad7 的表达，抑制 TGF-β_1/Smad 信号通路的信号传导，减少 Col-Ⅰ、Col-Ⅲ 表达。由于 TGF-β_1/Smad 信号通路与其他信号通路存在交叉对话，将进一步研究温阳化浊通络方对 SSc 成纤维细胞的干预功能，探讨其抗纤维化的作用机制。

参　考　文　献

[1] 卞华，吕芹. 温阳化浊通络汤治疗早期系统性硬化病临床观察[J]. 四川中医，2009，27(6)：66-67.

[2] 卞华，范永升，楼兰花，等. 温阳化浊通络方对系统性硬化病成纤维细胞周期和增殖的影响[J]. 中药材，2009，32(6)：936-939.

[3] Subcommittee for Scleroderma Criteria of American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma)[J]. Arthritis Rheum，1980，23(5)：581-590.

[4] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则(第二辑)[M]. 北京：人民卫生出版社，1995：196-198.

[5] Freshney RI. Culture of animal cells：a manual of basic technique[M]. 5th ed. USA：John Wiley & Sons Inc，2008：175-198.

[6] Gilbane AJ，Denton CP，Holmes AM. Scleroderma pathogenesis：a pivotal role for fibroblasts as effector cells[J]. Arthritis Res Ther，2013，15(3)：215.

[7] Viswanath V，Phiske MM，Gopalani VV. Systemic sclerosis：current concepts in pathogenesis and therapeutic aspects of dermatological manifesta-

tions[J]. Indian J Dermatol, 2013, 58(4): 255 -268.
[8] Dong C, Zhu S, Wang T, et al. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(6): 3908 -3913.
[9] Wei J, Bhattacharyya S, Warren G, et al. Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy[J]. Autoimmun Rev, 2011, 10(5): 267 -275.
[10] Tomcik M, Zerr P, Pitkowski J, et al. Heat shock protein 90 (HSP90) inhibition targets canonical TGF-β signaling to prevent fibrosis [J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(6): 1215 -1222.
[11] Leask A. Possible strategies for anti-fibrotic drug intervention in scleroderma[J]. J Cell Commun Signal, 2011, 5(2): 125 -129.
[12] 卞华, 吕振领. 温阳化浊通络方对 30 例系统性硬化病患者甲襞微循环的影响[J]. 国医论坛, 2009, 24(4): 19 -20.
[13] 吕芹, 卞华, 陈志国, 等. 温阳化浊通络方含药血清对硬皮病成纤维细胞胶原分泌和 TGF-β_1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 184 -187.
[14] 林海燕, 王红梅, 祝诚. 转化生长因子-β 对基质金属蛋白酶及其组织抑制因子调控的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(1): 7 -12.
[15] Meng C, Chen X, Li J, et al. Expression of MMP-9 and TIMP-1 in lesions of systemic sclerosis and its implications[J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2008, 28(4): 480 -482.

(收稿:2014 -06 -18 修回:2015 -05 -25)

·书 讯·

中国皮肤科发展的里程碑——祝贺《中国皮肤科学史》出版

《中国皮肤科学史》是一本关于中国皮肤科的史书,以时间为线索:详细阐述古代、近代和现代皮肤科学史的发展,从远古时期皮肤科的萌芽及发生开始谈起,一直到现代皮肤科的传承、发展与成就,每一时代皮肤科史发展的重点事件历历在目。以学科特点为线索:全面记录了中医、西医和中西医结合皮肤病学的发展历史。西医皮肤科从 1840 年西方医学传入中国伊始,经过近现代中国皮肤科专家的辛苦创业日渐成熟发展,在皮肤科常见病、危重疾病治疗、皮肤科学临床与基础研究、性病防治、麻风防治等方面取得了可喜的成就,令人振奋。

中医皮肤病学是祖国医学宝库中一块璀璨的瑰宝,了解中医皮肤病学的发展历史,对于中医学更好地传承、发展、创新实属必需。我从事中医皮肤科几十载,鲜有能全面记载中医皮肤科学史的专著。由马振友、张建中、郑怀林主编的《中国皮肤科学史》的出版,填补了本学科的空白,对中医皮肤科学的发展具有里程碑的意义。

中医皮肤病学的发展经历了古代中医疡科成就辉煌、近代中医皮肤科学传承和发展、现代中医皮肤科学创建和发展三大时期。从成就辉煌的古代疡科谈起,如家喻户晓的第一部系统的药物性著作《神农本草经》记载的皮肤病有疥、白秃、癣、息肉、黑子等;标志着中医学理论体系确立的经典巨著《黄帝内经》中有关篇目分别论述了皮肤解剖、病理、生理,皮肤附属器及皮肤病的诊疗;甲骨文中涉及皮肤及皮肤病的有近百字,可见中医皮肤学的发展历史源远流长。近代中医皮肤科学传承与发展,涌现出了如吴师机、马培之等著名医家,陆清洁撰写了中医《皮肤病》,首次正式提出中医皮肤病的概念。继承传统医学,尊古而不拘泥于古。现代皮肤科学的进步也为中医皮肤科学的不断完善与发展输注了新鲜血液。今天,中医皮肤科学也开始走向世界。先辈们的探索,现代人的专注研究,中医皮肤科学的发展无不彰显着祖国医学的魅力。

广州中医药大学国医大师 禤国维

中国中西医结合杂志