

迷迭香二萜芬提取物对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β_1 及其信号通路分子 mRNA 表达的影响

杨礼腾¹ 刘欣² 程德云³ 方洵³ 穆茂³ 胡晓波³ 聂莉³

摘要 **目的** 探讨迷迭香二萜芬提取物(diterpene phenol extract of *Rosmarinus Officinalis*, DERO)调控肺纤维化肺胶原代谢失衡的作用机制。**方法** 50 只健康 SD 大鼠,随机分为生理盐水组(NS 组)、博来霉素肺损伤组(BLM 组)及 DERO 低、中、高剂量[50、100、200 mg/(kg·d)]组(分别简称为 DERO1、2、3 组),每组 10 只,通过博来霉素一次性气管内滴入复制肺纤维化大鼠模型,并在肺损伤修复过程中予 DERO 灌胃干预,于第 29 天早上取大鼠肺组织,运用组织芯片,进行 HE、胶原纤维染色及免疫组化、原位杂交,分别检测肺组织有核细胞数、胶原蛋白、I 型胶原(type I collagen, Collagen-I)和转化生长因子 β II 型受体(transforming growth factor-beta type II receptor, TGF β R II)、Smad4 mRNA 的表达,应用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测转化生长因子 β_1 (transforming growth factor-beta₁, TGF- β_1) mRNA 的表达。**结果** 与 NS 组比较,BLM 组肺组织胶原沉积明显,炎症浸润程度较重($P < 0.05$, $P < 0.01$),DERO1 组与 BLM 组比较,两项指标差异无统计学意义($P > 0.05$),DERO2 及 DERO3 组肺组织胶原沉积及炎症浸润程度皆明显减轻($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 NS 组比较,BLM 组肺组织 Collagen-I、TGF- β_1 R II、Smad4 mRNA 及 TGF- β_1 mRNA 表达明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$),与 BLM 组比较,DERO1 组 4 项指标变化不明显($P > 0.05$),而 DERO2 及 DERO3 组, Collagen-I、TGF- β_1 R II 及 TGF- β_1 mRNA 表达皆有明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$),但两组 Smad4 mRNA 下调不明显($P > 0.05$),与 DERO1 组比较,DERO2 及 DERO3 组除 Smad4 mRNA 外,余 3 项指标皆低于 DERO1 组($P < 0.05$),而 DERO2 组与 DERO3 组比较,4 项指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** DERO 在肺纤维化胶原代谢失衡中具有调控作用,能抑制胶原纤维的过度沉积,尤其是 Collagen-I 的过度沉积,其作用机制可能主要是通过抑制 TGF- β_1 、TGF β R II mRNA 表达的上调,从而干扰 TGF- β -Smad 信号通路对靶基因尤其是 I 型前胶原靶基因的激活而实现的。

关键词 肺纤维化;转化生长因子 β_1 ;迷迭香;胶原

Effects of Diterpene Phenol Extract of *Rosmarinus Officinalis* on TGF β_1 and mRNA Expressions of Its Signaling Pathway Molecules in the Lung Tissue of Pulmonary Fibrosis Rats YANG Li-teng¹, LIU Xin², CHENG De-yun³, FANG Xun³, MU Mao³, HU Xiao-bo³, and NIE Li³ 1 Department of Respiratory Disease, Hospital of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Southern Medical University, Guangzhou (510315), China; 2 Department of Basic Chinese Medicine Theory, Faculty of Chinese Medicine, Zunyi High Training School of Medicine/Pharmacology, Guizhou (563000), China; 3 Department of Respiratory Disease, Huaxi Hospital, Sichuan University, Chengdu (610041), China

ABSTRACT **Objective** To investigate the regulative mechanism of the diterpene phenol extract of *Rosmarinus Officinalis* (DERO) on the imbalance of collagen metabolism of the lung tissue in pulmonary fibrosis rats. **Methods** Fifty healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into the normal saline group (NS), the bleomycin-induced lung injury group (BLM), the low dose DERO group (at the daily dose of 50 mg/kg), the moderate dose DERO group (at the daily dose of 100 mg/kg), and the high dose DERO group (at the daily dose of 200 mg/kg), 10 in each group (abbreviated as DERO 1, 2, 3, respec-

作者单位:1.南方医科大学中西医结合医院呼吸内科(广州 510315);2.遵义医药高等专科学校中医系中医基础教研室(贵州遵义 563000);3.四川大学华西医院呼吸内科(成都 610041)

通讯作者:杨礼腾, Tel:18620058677, E-mail:yang20002003@126.com

tively). The pulmonary fibrosis rat model was prepared by disposable intratracheal instillation of bleomycin. DERO was administered by gastrogavage as intervention during the repairing process of lung injury. On the morning of the 29th day, the rats' lung tissue was extracted. The karyocyte number, collagen protein, type I collagen (collagen I) and transforming growth factor-beta type II receptor (TGF β R II), Smad4 mRNA expressions were semi-quantitatively determined using tissue microarray, HE staining, collagen fiber dyeing, immunohistochemical assay, and in situ hybridization. Using real-time fluorescent quantification RT-PCR, the mRNA expression of transforming growth factor-beta₁ (TGF- β ₁) were detected. Results Compared with the NS group, the collagen deposition of the lung tissue was obvious and the inflammatory infiltration was more severe in the BLM group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was no statistical difference in the aforesaid 4 indices between the DERO1 group and the BLM group ($P > 0.05$). The collagen deposition and the inflammatory infiltration were obviously alleviated in the DERO2 and DERO3 groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the NS group, the mRNA expressions of collagen-I, TGF- β ₁ R II, Smad4, and TGF- β ₁ were obviously up-regulated in the BLM group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the BLM group, the aforesaid four indices were not statistically changed in the DERO1 group ($P > 0.05$). But the mRNA expressions of collagen-I, TGF- β ₁ R II, Smad4, and TGF- β ₁ were obviously down-regulated in the DERO2 and DERO3 groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). But the down-regulation of Smad4 expression was not obvious in the DERO2 and the DERO3 groups ($P > 0.05$). Compared with the DERO1 group, the mRNA expressions of collagen-I, TGF- β ₁ R II, TGF β ₁ were all obviously lower in the DERO2 and the DERO3 groups ($P < 0.05$). But there was no statistical difference in the aforesaid 4 indices between the DERO2 group and the DERO3 group ($P > 0.05$). Conclusions DERO could regulate imbalanced collagen metabolism of pulmonary fibrosis. It could inhibit excessive deposition of collagen fibers, especially excessive deposition of collagen-I. Its mechanisms might be realized by inhibiting up-regulation of TGF- β ₁ and TGF β R II mRNA expressions, thus interfering the activation of TGF- β -Smad signaling pathway on target genes, especially on type I precollagen target gene.

KEYWORDS pulmonary fibrosis; transforming growth factor-beta₁; *Rosmarinus Officinalis*; collagen

肺间质纤维化为肺损伤后肺间质过度修复,肺间质结缔组织代谢失衡而使细胞外基质过度沉积所致,其主要改变为胶原过度沉积,而转化生长因子 β ₁ (transforming growth factor β ₁, TGF- β ₁) 是主要由肺实质细胞合成分泌而作用于成纤维细胞为主的间质成分,是促进肺间质修复的有效刺激剂。迷迭香是一种原产于地中海沿岸的历史悠久的香料植物,1981 年由中国科学院首次引入我国并栽培成功,现在云南、贵州等地都有种植,已有研究证实,迷迭香具有抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、抗艾滋病、保肝降酶等作用^[1,2],主要成分为二萜酚类、黄酮类、三萜类及精油等,其二萜酚类成分也具有明显的抗氧化、保肝降酶的作用,对肺损伤后的炎症反应、间质过度修复有抑制作用,但对调控肺间质胶原过度沉积起主要作用的 TGF- β -Smads 信号通路的影响未见报道,故本项研究在于探讨迷迭香二萜芬提取物 (diterpene phenol extract of *Rosmarinus Officinalis*, DERO) 调控肺纤维化肺胶原代谢失衡的作用机制。

材料与方法

1 实验动物 健康 SD 大鼠 50 只, 150 ~ 250 g, 6 ~ 7 周龄, 雌雄各半, 四川大学华西动物实验中心提供, 生产许可证号: SCXK (川) 2005 - 09, 饲养于四川大学华西动物饲养中心清洁级环境中。

2 仪器和试剂 FTC-2000 型荧光定量基因扩增仪 (加拿大枫岭公司), Image-pro plus 专业图像分析软件系统 (美国 Media Cybernetics 公司), TaqDNA 聚合酶和脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) (立陶宛 MBI 公司), 引物探针 (上海生物工程有限公司), Trizol 试剂 (美国 MRC 公司, 批号: TR118 - 200)。转化生长因子 β II 型受体 (transforming growth factor-beta type II receptor, TGF- β R II) 和 Smad4 原位杂交试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 MK1433r、MK1212r)。

3 药物 博来霉素 (日本化药株式会社, 批号: Y32480), 15 mg/支; DERO 粉剂 (由贵州省生物研究所提供, 批号: 3650 - 09 - 7), 每克相当于生药材

20 g, 100 g/包。

4 方法

4.1 动物分组 健康 SD 大鼠 50 只, 实验条件下饲养 1 周后, 先按性别分层并据随机数字表法分为生理盐水组 (NS 组)、博来霉素肺损伤组 (BLM 组) 及 DERO 低 [50 mg/(kg · d)]、中 [100 mg/(kg · d)]、高 [200 mg/(kg · d)] 剂量组 (分别简称为 DERO1、2、3 组), 每组 10 只。

4.2 肺间质纤维化模型的建立 参考文献[3, 4]。(1)大鼠称重后, 予速眠新 II (1 mL/kg) 大腿外侧肌肉注射麻醉并固定于鼠台上, 无菌操作下于颈前正中切开皮肤 2~3 cm, 钝性分离至气管, 用 7 号针头连 1 mL 注射器, 于气管环间刺入气管后平行进气管, 将针头斜面贴近气管前壁缓慢滴入博来霉素 (5 mg/kg), 然后缝合切口, 将大鼠直立旋转使药液于肺内分布均匀, 放回笼中正常饲养, 并从即日起, BLM 组每天灌胃生理盐水 3 mL, 而 DERO 各组, 从第 2 天起, 每天予 DERO 粉剂分别按上述分组剂量, 溶于 3 mL 生理盐水中灌胃。(2) NS 组气管内滴入生理盐水 0.2~0.3 mL, 并每天灌胃生理盐水 3 mL; (3) 在文献[3, 4]方法的基础上, 从肺组织病理改变、胶原染色定量等方面对肺间质纤维化模型进行鉴定。

4.3 标本的收集 参考文献[4]。所有大鼠于第 29 天早上 8:00~9:00 点称体重后予速眠新 II 麻醉下于腹主动脉放血致死并取标本, 先称取肺重量后用 4% 多聚甲醛灌注左肺后剪下左肺下叶于 4% 多聚甲醛中固定, 同时剪下右肺下叶用无菌锡铂纸包裹后于液氮罐中速冻保存备用。

4.4 组织芯片的制作 参考文献[5]。肺组织于 4% 多聚甲醛中固定 8 h 后制成蜡块, 并将 BLM 组作切片 (6 μ m), 用于从免疫组化水平鉴定组织芯片用。之后按文献[5]方法操作, 将所有蜡块用于制作组织芯片, 共制作 4 套组织芯片蜡块, 同一组织芯片块上含有各组标本, 每套两个组织芯片蜡块, 每个蜡块含 30 点阵, 每个点阵直径 2 mm。切片: 将组织芯片蜡块于切片机上切片 (6 μ m), 漂片粘贴于玻片上于 80 $^{\circ}$ C 烘烤 3 h 后室温下保存, 分别用于 HE 及胶原纤维染色、免疫组化检测 I 型胶原纤维 (type I collagen, Collagen-I) 和原位杂交检测 TGF- β R II 及 Smad4 的 mRNA 表达。鉴定: 肉眼及用胶原纤维染色, 观察玻片上各点阵情况, 若点阵上各点完整无缺失则组织芯片合格。此外, 从免疫组化 Collagen-I 定量比较组织芯片与原蜡块 (BLM 组) 以鉴定组织芯片对原蜡块的代表性。

4.5 相关指标的检测

4.5.1 胶原纤维染色 采用显示胶原纤维细胞和肌肉的新染法 (胶原新染法), 按文献[6]法进行。

4.5.2 Collagen-I 的检测 用免疫组化法, 按文献[6]方法操作。

4.5.3 TGF- β R II 及 Smad4 mRNA 表达的原位杂交检测 参考文献[6]并按试剂盒说明书操作。

4.5.4 图像采集、处理及分析定量 参考文献[4, 7]。利用 Image-pro plus 专业图像分析软件系统, 于组织芯片上的每点 (包括部分石蜡切片) 的左右上下 4 个视野各采集 1 张 100 倍的图像用于图像处理及分析, 4 张图像的平均值代表该芯片上该指标的量, 4 套芯片上相对应的同一指标的 4 点再取平均值, 代表该大鼠肺组织的该指标的量: (1) HE 染色, 运用图像分析软件的计数功能对图像上的细胞核行颜色分离后自动计数有核细胞总数, 每个细胞核代表一个有核细胞 (包括肺组织结构细胞和炎性渗出的白细胞), 并与正常对照组有核细胞数的均数比较, 其高出的差值越大, 示炎症程度越重 (其差值代表炎性白细胞浸润程度)。(2) 胶原纤维染色及免疫组化和原位杂交定量总胶原、Collagen-I 和 TGF- β R II 及 Smad4 的 mRNA, 运用图像分析软件先进行颜色分离, 然后自动计算其积分光密度 (IOD); IOD 为各个单独探测到的像素光密度的总和, 包含了横向的面积和纵向的像素深度, 其值越大示所检测指标含量越高, 故胶原和 Collagen-I IOD 越大示纤维化程度越重。

4.5.5 肺组织 TGF- β ₁ mRNA 表达的实时荧光定量 RT-PCR 检测 参考文献[4, 7]。(1) 引物探针: ① TGF β ₁ 上游引物: 5'-ACTACTGCTTCAGCTC-CACA-3', 下游引物: 5'-GTGTCCAGGCTCCAAAT-GT-3', TaqMan 探针: 5'-CCAAGGGCTACCATGC-CAAC-3'。② 内参基因: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 上游引物: 5'-TGGGTGTGAAC-CACGAGAA-3', 下游引物: 5'-GGCATGGACTGTG-GTCATGA-3', TaqMan 探针: 5'-CTGCACCAC-CAACTGCTTAGC-3'。(2) 剪取冻存的肺组织 50~80 mg, 按 Trizol 试剂盒说明书操作, 提取总 RNA 并逆转录成 cDNA, 然后按文献[2]方法进行 PCR 扩增目的基因: ① 用假定初始拷贝数的 cDNA 模板按 10 倍梯度稀释, 制成标准模板系列, 自每个稀释模板中取样 5 μ L, 分别加入 30 μ L 的反应体系中, 用 FTC-2000 型荧光定量基因扩增仪进行 PCR 以制作标准曲线。② 将 cDNA 样品中各取 5 μ L, 在同样的反应条件下行

PCR 扩增,并测定各样品的 Ct 值与标准曲线进行比较,得出待侧样品的相对拷贝数。③据上述方法分别计算各个标本待测靶基因和内参基因的相对拷贝数,再将同一样本靶基因除以其内参基因,获得校正后的相对拷贝数,进行统计学分析。

4.6 统计学方法 采用统计软件 SPSS 13.0 进行数据的统计处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料先进行方差齐性检验,计数资料先变量转换,皆行单因素方差分析,两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 动物死亡情况 DERO1 组于第 3 天死亡 1 只,解剖肉眼观察见双肺弥漫性出血、淤血及水肿,分析为博来霉素严重肺损伤致呼吸衰竭而亡。余组无死亡。

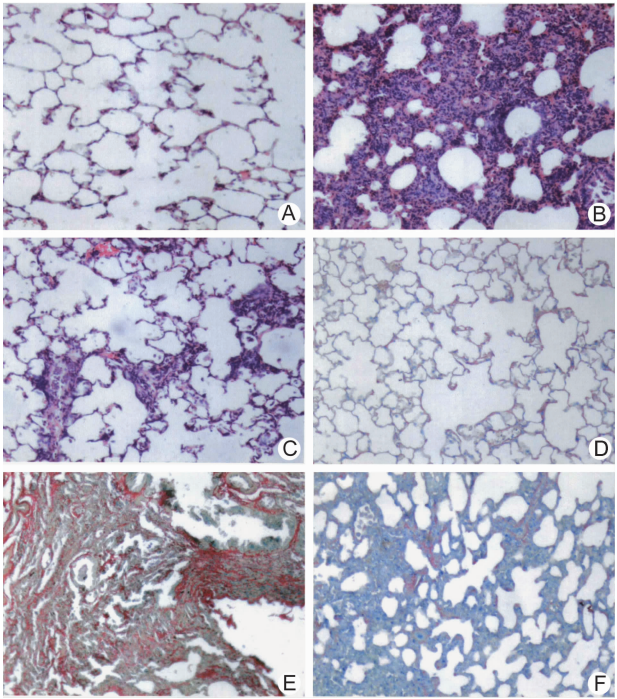
2 动物表现 BLM 及 DERO1 组大鼠取食排便活动均减少,DERO2、3 组上述表现不明显,NS 组活动取食及排便活动皆活跃。

3 病理改变

3.1 肉眼观察 NS 组肺表面光滑,呈粉红色,弹性良好。BLM 组肺呈暗红色,但色泽不均,相间有正常肺色泽,体积增大,弹性较差,表面凹凸不平。DERO 各组肺病变表现相对较轻,表面光滑,仍呈暗红色,但色泽均匀,弹性尚可。

3.2 光镜观察(图 1) NS 组肺组织结构清晰,肺泡壁未见增厚,肺泡上皮细胞结构完整,胶原染色示无明显胶原沉积。BLM 组肺泡间隔显著增宽,肺泡腔变形、闭塞,成纤维细胞及其基质增生,其中有较多的单核细胞、淋巴细胞和浆细胞浸润,胶原染色示红色的胶原条索状弥漫沉积,交织成网。DERO1 组与 BLM 组相似。DERO2、3 组肺泡间隔增宽较模型组明显减轻,仅部分肺泡隔增宽,部分肺泡腔变小或呈裂隙状,尚有正常肺泡结构,与 NS 组比较病变仍存在,但胶原染色示胶原沉积明显减少,且炎症细胞浸润明显减轻。

4 各组肺组织炎症及胶原沉积程度比较(表 1) 与 NS 组比较,BLM 组肺组织胶原沉积明显,炎症浸润程度较重($P < 0.05, P < 0.01$),DERO1 组与 BLM 组比较,两项指标差异无统计学意义($P > 0.05$),DERO2 及 DERO3 组与 BLM 组比较,肺组织胶原沉积及炎症浸润程度皆明显减轻($P < 0.05, P < 0.01$),但 DERO2 与 DERO3 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 为 HE 染色 NS 组,B 为 HE 染色 BLM 组,C 为 HE 染色 DERO3 组,D 为胶原染色 NS 组,E 为胶原染色 BLM 组,F 为胶原染色 DERO3 组

图 1 各组大鼠肺组织光镜下表现 (×100)

表 1 各组大鼠肺组织炎症及胶原沉积程度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胶原(IOD)	有核细胞总数($\times 10^4$)
NS	10	0.231 7 $\pm$ 0.149 7	1.149 6 $\pm$ 0.559 9
BLM	10	0.957 8 $\pm$ 0.375 6 **	2.224 4 $\pm$ 0.501 2 *
DERO1	9	0.818 1 $\pm$ 0.221 0	2.118 1 $\pm$ 0.221 0
DERO2	10	0.510 2 $\pm$ 0.021 0 Δ	1.318 1 $\pm$ 0.125 0 Δ
DERO3	10	0.328 1 $\pm$ 0.121 5 $\Delta\Delta$	1.187 2 $\pm$ 0.350 5 Δ

注:与 NS 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 BLM 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

5 DERO 对肺纤维化大鼠肺组织 Collagen-I 及 TGF- β_1 RII、Smad4 mRNA、TGF- β_1 mRNA 表达的影响(表 2) 与 NS 组比较,BLM 组肺组织 Collagen-I、TGF- β_1 RII、Smad4 mRNA 及 TGF- β_1 mRNA 表达明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。与 BLM 组比较,DERO1 组 4 项指标变化不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$),而 DERO2 及 DERO3 组,Collagen-I、TGF- β_1 RII 及 TGF- β_1 mRNA 表达皆有明显下调,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),但两组 Smad4 mRNA 下调不明显($P > 0.05$)。与 DERO1 组比较,DERO2 及 DERO3 组除 Smad4 mRNA 外,余 3 项指标皆低于 DERO1 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 DERO2 组与 DERO3 组比较,4 项指标差异无统计学差异($P > 0.05$)。

表 2 DERO 对肺纤维化大鼠肺组织 Collagen- I 及 TGF- β_1 R II、Smad4 mRNA、TGF- β_1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Collagen- I (IOD)	TGF- β_1 R II mRNA (IOD)	Smad4 mRNA (IOD)	TGF- β_1 mRNA
NS	10	0.323 4 $\pm$ 0.171 7	0.069 9 $\pm$ 0.035 0	0.073 6 $\pm$ 0.034 5	0.002 5 $\pm$ 0.003 0
BLM	10	0.934 8 $\pm$ 0.377 4 **	0.193 2 $\pm$ 0.107 6 *	0.171 7 $\pm$ 0.096 2 *	0.017 0 $\pm$ 0.015 7 **
DERO1	9	0.804 5 $\pm$ 0.279 6	0.182 2 $\pm$ 0.101 8	0.157 7 $\pm$ 0.083 2	0.015 2 $\pm$ 0.013 1
DERO2	10	0.504 5 $\pm$ 0.189 6 Δ^{Δ}	0.092 2 $\pm$ 0.021 8 Δ^{Δ}	0.148 7 $\pm$ 0.076 2	0.008 2 $\pm$ 0.008 1 Δ^{Δ}
DERO3	10	0.414 6 $\pm$ 0.179 8 $\Delta^{\Delta\Delta}$	0.075 2 $\pm$ 0.031 5 Δ^{Δ}	0.139 6 $\pm$ 0.085 2 Δ^{Δ}	0.007 2 $\pm$ 0.006 1 Δ^{Δ}

注:与 NS 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 BLM 组比较, $\Delta^{\Delta}P < 0.05$, $\Delta^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与 DERO1 组比较, $\Delta^{\Delta}P < 0.05$

讨 论

正常情况下,肺内胶原代谢处于动态平衡,对维持肺间质和肺泡的正常结构和功能起着十分重要的作用。肺间质纤维化为肺损伤后肺间质过度修复,肺间质缔结组织代谢失衡而使细胞外基质过度沉积所致,主要改变为胶原代谢失衡。在胶原代谢失衡中, Collagen- I 和 III 型胶原代谢失衡起主要作用,据认为 III 型胶原过度沉积尚可逆转, Collagen- I 的过度沉积将导致不可逆转的肺纤维化^[8],而 TGF- β_1 是目前已知的对胶原合成最直接和有效的刺激剂,也是调控肺间质过度修复的关键靶点,可刺激成纤维细胞分化为肌成纤维细胞,并抑制其凋亡,而肌成纤维细胞是活动性肺纤维化出现的标志^[9,10], TGF- β 活化后,与其 TGF- β_1 R II 特异性结合并导致 I 型受体的聚集与 TGF- β_1 R II 形成四聚体并磷酸化,继之使 Smad2 和 Smad3 磷酸化,使信号向下传导,最后, Smad2 和 Smad3 与 Smad4 形成复合物并移位至核内,激活相应的靶基因表达^[10,11],此外, Smad4 为重要的伴侣分子, TGF- β_1 R II 为信号转导的关键受体,故 TGF- β -Smads 信号通路是调控肺间质过度修复而防治肺纤维化的关键信号转导通路,而 TGF- β_1 、TGF- β_1 R II 及 Smad4 为关键靶点,通过关键靶点阻断 TGF- β -Smads 通路的信号转导对于肺纤维化的防治意义重大。

前期研究已证实 DERO 具有抑制肺损伤后的炎症反应和胶原尤其是 Collagen- I 的过度沉积而防止肺间质过度修复之作用^[2],其作用机制及对致肺损伤间质过度修复而纤维化的 TGF- β -Smads 信号通路激活之影响目前未见报道,本实验结果显示,DERO 中、高剂量组肺组织胶原及 Collagen- I 沉积和肺组织的炎症程度明显减轻,而低剂量组则对肺胶原及 Collagen- I 的沉积和炎症程度无明显影响,而中、高剂量组之间比较呈现量效关系之趋势,但统计学差异不明显,提示 DERO 对肺损伤后间质过度修复与肺组织炎症性损伤有明显抑制作用,这种作用随着 DERO

干预剂量的进一步增加,是否有明确的量效关系,有待进一步研究,而低剂量组无效,提示可能存在一个域值剂量,说明 DERO 确有调控肺损伤后间质过度修复而防治肺纤维化之作用,尤其在调控 Collagen- I 过度沉积而防止肺纤维化形成方面更具实用价值,这与前期研究^[2]结果一致。

此外,经鉴定及比较分析,组织芯片合格,可完全代替原组织石蜡标本用于效应指标的检测并更具优势。本实验结果显示,在肺纤维化肺间质胶原尤其 Collagen- I 过度沉积的同时,肺组织 TGF- β_1 、TGF- β_1 R II 及 Smad4 的 mRNA 表达皆明显上调,但经予 DERO 干预后,在中及高剂量组大鼠肺组织 TGF- β_1 及 TGF- β_1 R II 的 mRNA 表达上调明显抑制,这与胶原及 Collagen- I 的过度沉积明显减轻和肺炎症程度明显减轻相一致,但对 Smad4 mRNA 的表达上调抑制不明显,但在低剂量组,对 TGF- β_1 R II、Smad4 和 TGF- β_1 mRNA 的表达却无明显影响,说明 DERO 调控肺损伤后间质过度修复、纠正胶原代谢失衡而防治肺纤维化之作用机制可能主要是通过抑制 TGF- β_1 、TGF β R II 的 mRNA 表达上调,从而干扰 TGF- β -Smads 信号通路对靶基因尤其是 I 型前胶原靶基因的激活而实现的。

参 考 文 献

- [1] 饶光宇,陈秀芬,张高,等.迷迭香二萜酚提取物对几种肝损伤的保护作用[J].中草药,2001,32(5):434-443.
- [2] 杨礼腾,刘欣,程德云,等.迷迭香二萜酚提取物调控大鼠肺损伤间质过度修复的作用[C].第十二次全国呼吸病学学术会议论文汇编.广州:中华医学会呼吸病学会分会,2011:628-629.
- [3] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893-899.
- [4] 杨礼腾,程德云,聂莉,等.虫草菌粉对肺纤维化大鼠肺 TGF β_1 及信号通路分子 mRNA 表达的影响[J].四川中医,2006,24(2):23-25.

- [5] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughout molecular profiling of tumor specimens[J]. Nat Med, 1998, 4(7): 844 - 847.
- [6] 王伯坛,李玉松,黄高昇,等.主编.病理学技术[M].北京:人民卫生出版社,2000: 142 - 144,567 - 593, 840 - 853.
- [7] 杨礼腾,程德云,方洵,等.肾阳虚肺纤维化和肺纤维大鼠肺组织 GRmRNA 的表达[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1448 - 1451.
- [8] Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, et al. Etection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(7): 2853 - 2858.
- [9] 刘涛,宋良文.肺纤维化发生的分子机制和早期防治研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2003, 27(4): 312 - 316.
- [10] Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor β in lung development and disease [J]. Chest, 2004, 125(2): 754 - 765.
- [11] 宋雅芳,洪嘉禾,徐列明.中医药对 TGF- β_1 调控作用的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(1): 61 - 64.

(收稿:2012-07-21 修回:2012-11-23)

欢迎订阅 2013 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊,由中国科学院院士陈可冀担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖;2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”,列入中国期刊方阵;2003—2012 年连续 10 年被评为“百种中国杰出学术期刊”;3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助;4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”。并被多种国内外知名检索系统收录,如:中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国医学索引(MEDLINE)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)等;为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,被编入《中文核心期刊要目总览》,每年影响因子及总被引频次在中医药类期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本,月刊,144 页;铜版纸印刷,彩色插图。国内定价:20.00 元/期。全年定价:240.00 元。国际标准刊号:ISSN 1003 - 5370,国内统一刊号:CN 11 - 2787/R,国内邮发代号:2 - 52,国外代号:M640。国内外公开发售,在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京市海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010 - 62886827,62876547,62876548;传真:010 - 62874291;E-mail: cjim@cjim.cn;网址: http://www. cjim.cn