

本文引用:柏正平,刘雨,谭小宁,谭电波,邓秀娟,李仲普,刘俊,谭光波.金水六君煎及其拆方含药血清对A549细胞中黏蛋白MUC5AC及水通道蛋白AQP5表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(3):320-325.

金水六君煎及其拆方含药血清对 A549 细胞中黏蛋白 MUC5AC 及水通道蛋白 AQP5 表达的影响

柏正平¹,刘雨¹,谭小宁²,谭电波²,邓秀娟²,李仲普²,刘俊²,谭光波^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙 410006)

[摘要] **目的** 观察金水六君煎及其拆方含药血清对肺腺癌细胞 A549 黏液高分泌模型黏蛋白 5AC(MUC5AC)及水通道蛋白 5 (AQP5)表达的影响,探讨金水六君煎治疗气道黏液高分泌的作用机制。**方法** 将 A549 细胞分为空白组、模型组、金水六君煎组、养阴组、化痰组。采用人中性粒弹性蛋白酶 (HNE)25 nmmol/L 诱导 A549 细胞黏液高分泌,20%金水六君煎及其拆方含药血清干预 24 h。RT-PCR、Western blot 法检测细胞 MUC5AC、AQP5 基因与蛋白表达。ELISA 法检测细胞上清液 MUC5AC、AQP5 蛋白表达。**结果** 与空白组比较,模型组细胞 MUC5AC mRNA 与蛋白表达明显增多($P<0.05$),AQP5 mRNA 与蛋白表达明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,金水六君煎组及养阴组细胞 MUC5AC mRNA 表达明显降低($P<0.05$),AQP5 mRNA 表达明显增多($P<0.05$);化痰组 A549 细胞 MUC5AC 蛋白表达显著降低($P<0.01$),AQP5 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。模型组细胞上清液 MUC5AC、AQP5 蛋白表达较空白组差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 金水六君煎可明显抑制 A549 细胞 MUC5AC 产生,促进 AQP5 表达,纠正黏蛋白/水盐比例失衡可能是其治疗气道黏液高分泌的可能机制。

[关键词] 金水六君煎;A549 细胞;黏液高分泌;黏蛋白;水通道蛋白

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.03.008

Effects of Serum Containing Jinshui Liujun Decoction and Its Components on the Expression of Mucin MUC5AC and Aquaporin AQP5 in A549 Cell Mucus Hypersecretion Model

BAI Zhengping¹, LIU Yu¹, TAN Xiaoning², TAN Dianbo², DENG Xiujuan², LI Zhongpu², LIU Jun², TAN Guangbo^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Jinshui Liujun Decoction and its components on the expression of mucin 5AC (MUC5AC) and aquaporin 5 (AQP5) in the mucus hypersecretion model of human lung adenocarcinoma A549 cells, and to explore the mechanism of action of Jinshui Liujun Decoction in the treatment of airway mucus hypersecretion. **Methods** A549 cells were divided into blank group, model group, Jinshui Liujun Decoction group, Yin-nourishing group, and phlegm-resolving group. Mucus hypersecretion in A549 cells was induced using human neutral elastase (HNE) at a concentration of 25 nmmol/L, followed by intervention with 20% serum containing Jinshui Liujun Decoction and its components for 24 h. RT-PCR and Western blot were used to determine the mRNA and protein expression levels of MUC5AC and AQP5. Meanwhile, enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the expression of MUC5AC and AQP5 in cell supernatant. **Results** Compared with the blank group, the model group had significantly increased expression of MUC5AC mRNA and protein ($P<0.05$) and significantly reduced

[收稿日期] 2018-11-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81473564)。

[作者简介] 柏正平,男,主任医师,博士研究生导师,研究方向:中医药防治呼吸病研究。

[通讯作者] * 谭光波,男,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:tgb989@126.com。

expression of AQP5 mRNA and protein ($P<0.05$). Compared with the model group, the Jinshui Liujun Decoction group and the Yin-nourishing group had significantly reduced expression of MUC5AC mRNA ($P<0.05$) and significantly increased expression of AQP5 mRNA ($P<0.05$). The phlegm-revolving group showed a significant reduction in the expression of MUC5AC protein ($P<0.01$) and a significant increase in the expression of AQP5 protein ($P<0.05$). There was no significant difference in the protein expression of MUC5AC and AQP5 in cell supernatant between the model group and the blank group ($P>0.05$). **Conclusion** Jinshui Liujun Decoction can significantly inhibit the expression of MUC5AC and promote the expression of AQP5 in A549 cells. Its ability to correct the imbalance of mucin/water-salt ratio may be a possible mechanism for the treatment of airway mucus hypersecretion.

[**Keywords**] Jinshui Liujun Decoction; A549 cell; mucus hypersecretion; mucin; aquaporin

慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD) 是呼吸系统的一种慢性疾病,气道黏液高分泌是其重要病理生理特征,黏液高分泌可导致气道阻塞、气流受限、通风灌注错配及气体交换减值与细菌定植,从而加速 FEV1 下降过程^[1]。气道黏液高分泌除黏蛋白的绝对量增多外,还与黏蛋白/水盐比例失衡有关,其中黏蛋白 5(MUC5AC)决定黏液的黏度,水通道蛋白 5(aquaporin 5, AQP5)调节肺泡内的水的转运和黏蛋白/水盐比例。COPD 黏液高分泌机制中 MUC5AC 表达明显升高, AQP5 表达显著降低^[2]。金水六君煎出自《景岳全书》,临床主要应用于治疗阴虚痰饮证,临床研究能明显改善肺肾阴虚型慢性支气管炎及 COPD 患者咳喘痰多,药效学研究能明显增加气管液体分泌量,促进痰液排出^[3-6],但其治疗气道黏液高分泌机制研究未见报导。本文将金水六君煎拆方成养阴组分及化痰组分进行研究,采用人中性粒弹性蛋白酶诱导肺腺癌细胞 A549 建立气道黏液高分泌细胞模型,通过观察金水六君煎及其拆方对黏蛋白 MUC5AC、水通道蛋白 AQP5 表达的影响,探讨金水六君煎治疗气道黏液高分泌的可能机制,为金水六君煎临床治疗提供理论基础。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 40 只,鼠龄 10~12 周,体质量(220±20)g,由湖南省斯莱克实验动物中心提供,许可证号[SYXK(湘)2016-0002],合格证号: N0.43004700042712。饲养于温度 22~26 ℃、相对湿度 50%~70% 环境,通风换气 8~12 次/h,自由摄食饮水。

1.1.2 细胞株 肺腺癌 A549 细胞系(A549),购自

中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,批号:1606-1。

1.1.3 实验药物 金水六君煎方药组成根据《景岳全书》原方组成及剂量:熟地黄 15 g,当归 6 g,半夏 6 g,陈皮 4.5 g,茯苓 6 g,炙甘草 3 g。加入生姜 10 g。养阴组:熟地黄 15 g,当归 6 g。化痰组:半夏 6 g,陈皮 4.5 g,茯苓 6 g,炙甘草 3 g。中药饮片购自湖南省中医药研究院附属医院。

1.1.4 主要试剂 人中性粒弹性蛋白酶(英国 abcam 公司,货号:ab91099);DMEM(美国 HyClone 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);0.25%胰酶消化液(美国 Gibco 公司);1%青霉素和链霉素(上海慧颖生物技术有限公司);MUC5AC、AQP5 ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,货号:Y15037320、Y10037321);小鼠 MUC5AC 单克隆抗体(美国 SantaCruz 公司,货号:45M1);AQP5 兔多克隆抗体(英国 abcam 公司,货号:ab78486);HRP goat anti-mouse/Rabbit IgG(美国 Proteintech 公司),RIPA 裂解液/蛋白酶抑制剂,SuperECL Plus 超敏发光液(美国 Thermo 公司);5X 蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司); β -actin、MUC5AC、AQP5 引物(上海生工生物工程股份有限公司);逆转录试剂盒、UltraSYBR Mixture(北京康为世纪生物技术有限公司);SYBRGREEN I 核酸染料(北京普博欣生物科技责任有限公司)。

1.1.5 主要仪器 细胞培养箱(美国 Thermo 公司,HERAcell 2401);倒置显微镜(北京同舟同德仪器仪表有限公司,DSZ2000);全自动酶标仪(意大利 Diasorin 公司,MAX3000);台式冷冻离心机(力新仪器上海有限公司,Neofuge23R);电泳仪(美国 Biorad,164-5050);转膜仪(北京六一仪器厂,DYCZ-40A);全自动凝胶成像分析系统(英国 Syngene 公司,

GBOX-H12-E-M); 荧光 PCR 板(美国 Thermo 公司, SPL0960); 荧光定量 RCP 仪(美国 Thermo 公司, PIKO REAL96)。HERAcell2401

1.2 方法

1.2.1 含药血清制备 按照随即数字表法将 40 只雄性 SD 大鼠平均分为空白组、金水六君煎组、养阴组、化痰组, 每组 10 只。大鼠给药剂量参考按中药血清药理学研究通法^[7](给药剂量=临床常用量×动物有效剂量系数×培养基内的稀释度)。参考人和动物体表面积折算的等效剂量比率表, 大鼠的等效剂量相当于人的 6.3 倍, 每只动物每千克体质量给药量按临床人(70 kg)的等效量, 培养基内血清的稀释度为 5 倍。换算出生金水六君煎组、养阴组、化痰组生药含量分别为: 22.72 g/kg、9.45 g/kg、8.77 g/kg。中药煎煮按生药量加入 10 倍水, 煎煮 1 h 保存药液, 药渣再加入 8 倍量水, 煎煮 1 h, 合并过滤去沉淀浓缩成所需浓度: 2.27 g/mL、0.96 g/mL、0.88 g/mL。参考目前常用“通法”^[8], 按照 10 mg/kg 灌胃量每天给药 2 次, 连续 3 d, 空白对照组灌胃等体积生理盐水。末次给药 1 h 后无菌条件下腹主动脉采血, 3 000 r/min 离心 5 min, 取血清, 同组血清相混合, 置于 56 °C 水浴灭活补体 30 min, 过滤器(0.22 μm 孔径)过滤除菌, -20 °C 保存备用。

1.2.2 细胞培养 将 A549 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/m 青链霉素的 DMEM 培养液中, 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养, 每 2 d 换液 1 次, 按 1:3 比例传代。

1.2.3 细胞分组及干预 取对数期细胞进行实验, 分为正常对照组、模型组、金水六君煎组、养阴组和化痰组, 每组设 3 个复孔。黏液高分泌细胞模型制备参考兰箭^[9]人中性粒细胞弹性蛋白酶(human neutrophil elastase, HNE)诱导法。根据预实验结果采用终浓度为 25 nmmol/L HNE, 20% 含药血清干预细胞。每孔以 1×10⁵/mL 密度接种于 6 孔板, 加入 DMEM 培养基+10%FBS, 37 °C、5%CO₂ 培养箱培养 24 h 至细胞贴壁。去原培养基, 加入无血清 DMEM 培养基, 37 °C、5%CO₂ 培养箱饥饿培养 24 h。去培养基, 以孔为单位, 分为空白组(加入 20% 空白组大鼠血清)、模型组(加入 20% 空白组大鼠血清和终浓度为 25 nmmol/L HNE)、金水六君煎组(加

入 20% 金水六君煎含药血清和终浓度为 25 nmmol/L HNE)、养阴组(加入 20% 养阴组含药血清和终浓度为 25 nmmol/L HNE)、化痰组(加入 20% 化痰组含药血清和终浓度为 25 nmmol/L HNE), 37 °C、5%CO₂ 培养 24 h 后收集细胞及培养液上清进行检测。

1.2.4 RT-PCR 法检测 A549 细胞 MUC5AC、AQP5 基因表达 吸掉各组 A549 细胞上层培养液, 向 A549 细胞中加入 1 mL Trizol 室温裂解 5 min 后充分吹打, 采用酚/氯仿萃取法提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度以及 260、280 nm 处吸光度值, 计算其纯度。按 HiFiScript cDNA Synthesis Kit 说明书合成 cDNA, 然后以 cDNA 为模板按 UltraSYBR Mixture 合成试剂盒说明书进行扩增。反应体系: 2×SYB-GREEN PCR Master Mix 15 μL, Primer F (10 μmol/L) 1 μL, Primer R (10 μmol/L) 1 μL, ddH₂O 11 μL, cDNA 2 μL, 总体积共 30 μL。扩增条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 50 s, 共 40 个循环。根据所得 Ct 值, 以 β-actin 为内参、空白组样本为对照样品计算 2^{-ΔΔCt}, 得到目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列

基因	引物	长度/bp
β-actin	上游 5'-ACCCTGAAGTACCCCATCGAG-3'	224
	下游 5'-AGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'	
MUC5AC	上游 5'-ACCAGCATCTTCATCAACCT-3'	137
	下游 5'-TTCCCAAACCTCCAGCAGTC-3'	
AQP5	上游 5'-ACCTGCTCTTCCCAACTCCC-3'	90
	下游 5'-GCTGCTCCTCCAGTCTCTCGT-3'	

1.2.5 Western blot 法检测 A549 细胞 MUC5AC、AQP5 蛋白表达 用预冷 PBS 洗涤各组 A549 细胞, 吸掉上清, 加入 160 μL RIPA 裂解液冰上裂解 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 提取总蛋白。按照 BCA 蛋白定量试剂盒操作说明测定蛋白浓度。分别配制分离胶浓度为 8% (分离 MUC5AC) 和 10% (分离 AQP5 及 β-actin) SDS-聚丙烯酰胺凝胶。在加样孔按顺序加入蛋白样本 20 μL 及蛋白 Marker 3 μL, 按浓缩胶恒压 80 V, 分离胶 120 V 进行电泳, 待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳。湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜, 恒流 300 mA MUC5AC 约 2 h, AQP5 及 β-actin 约 1 h。5% 脱脂奶粉室温封闭

1.5 h,加入 1×TBST 稀释的小鼠 MUC5AC 单克隆抗体(1:200)、AQP5 兔多克隆抗体(0.1 ug/mL)和 β-actin (1:5 000),4 ℃冰箱孵育过夜。孵育结束后 1×TBST 洗 3 次×10 min,加入辣根过氧化物酶标记鼠二抗和兔二抗(1:5 000),室温下孵育 1.5 h,1×TBST 洗涤 3 次后置于 ECL 发光液中显影,暗室曝光冲印,采用 BioRad 成像系统分析电泳条带,Quantity-One 图像分析软件计算基因与 β-actin 比值。

1.2.6 ELISA 法检测 A549 细胞上清液 MUC5AC、AQP5 蛋白表达 吸取各组 A549 细胞培养液 1 mL 置于 1.5 mL EP 管,4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min 沉淀悬浮细胞,取上清液 500 μL 进行实验。严格按照试剂盒说明书进行标准品、酶结合物、显色剂制备和样品稀释,在反应终止后 10 min 内用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度(OD 值),通过标准曲线计算各样品浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件对结果进行统计学分析,所有数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。资料符合正态性及方差齐性时,组间比较采用单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA);不满足正态性或方差齐性时,采用非参数检验秩和检验。结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 A549 细胞 MUC5AC mRNA、AQP5 mRNA 表达

与空白组比较,模型组 A549 细胞 MUC5AC mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$),AQP5 mRNA 表达明显减

少 ($P < 0.05$)。与模型组比较,金水六君煎组及养阴组 MUC5AC mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$),AQP5 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$),化痰组 MUC5AC mRNA、AQP5 mRNA 表达较模型组无明显差异 ($P > 0.05$),结果见表 2。MUC5AC 与 AQP5 扩增曲线和溶解曲线如图 1。

表 2 各组 A549 细胞 MUC5ACmRNA、AQP5mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	MUC5AC	AQP5
空白组	1.26±0.24	1.25±0.32
模型组	2.33±0.48 [△]	0.31±0.15 [△]
金水六君煎组	1.39±0.32*	0.63±0.13 ^{△*}
养阴组	1.47±0.11*	0.75±0.15*
化痰组	2.19±0.39 [△]	0.17±0.10 ^{△△}

注:与空白对照组比较,△ $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$

2.2 各组 A549 细胞 MUC5AC、AQP5 蛋白表达

与空白组比较,模型组 A549 细胞 MUC5AC 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$),AQP5 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较,金水六君煎组及化痰组 MUC5AC 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),化痰组 AQP5 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$),金水六君煎组及养阴组 AQP5 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3,图 2。

2.3 各组 A549 细胞培养液 MUC5AC、AQP5 蛋白表达

与空白组比较,各组培养液中 MUC5AC、AQP5 蛋白表达无明显差异 ($P > 0.05$)。与模型组比较,金水六君煎组及养阴组培养液 AQP5 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。见表 4。

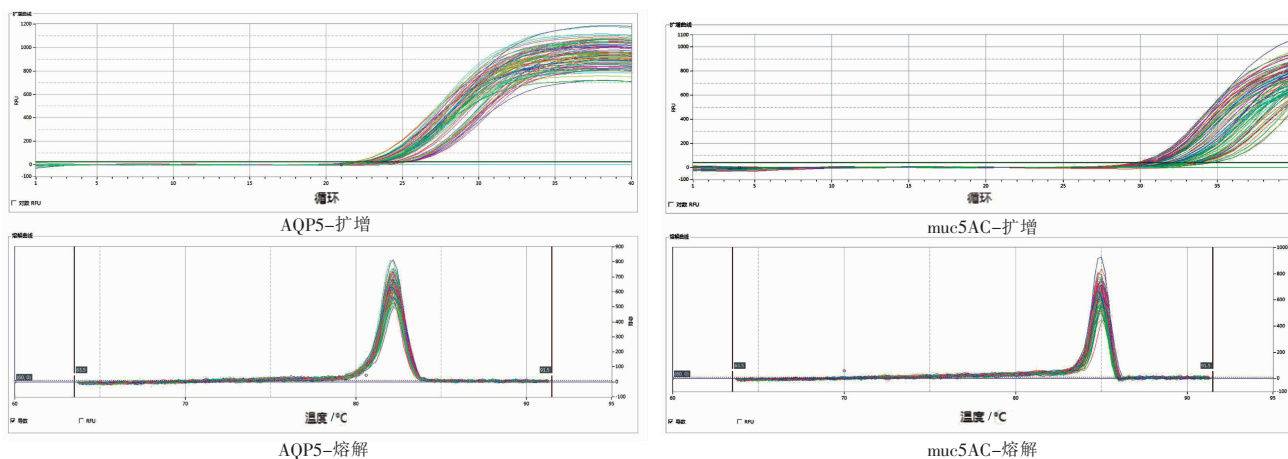
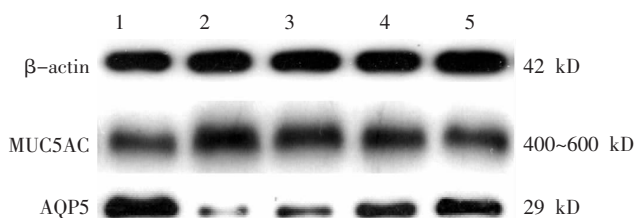


图 1 MUC5AC、AQP5 扩增及溶解曲线

表3 各组 A549 细胞 MUC5AC、AQP5 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	MUC5AC	AQP5
空白组	0.27±0.06	0.62±0.16
模型组	0.52±0.06 ^{△△}	0.17±0.13 [△]
金水六君煎组	0.35±0.06*	0.24±0.05 [△]
养阴组	0.44±0.06 [△]	0.37±0.11
化痰组	0.29±0.05**	0.48±0.12*

注:与空白对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$



注:1 空白组;2 模型组;3 金水六君煎组;4 养阴组;5 化痰组

图2 各组 A549 细胞 MUC5AC、AQP5 蛋白表达免疫印迹图

表4 各组 A549 细胞培养液中 MUC5AC、AQP5 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	MUC5AC/(ng·mL ⁻¹)	AQP5/(pg·mL ⁻¹)
空白组	638.10±188.58	60.64±4.53
模型组	428.42±42.57	53.58±3.16
金水六君煎组	399.32±44.59	63.76±2.84*
养阴组	567.53±168.03	76.82±12.14*
化痰组	511.92±71.00	63.94±6.80

注:与模型组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

3 讨论

气道黏液高分泌是 COPD 重要的病理特征,与 COPD 患者的肺功能加速下降、急性加重及高住院治疗率密切相关,祛痰治疗应面向所有的 COPD 患者^[10]。MUC5AC 是成人呼吸道最主要的黏蛋白,气道黏液高分泌过程 MUC5AC 表达明显升高。AQP5 主要表达于肺内且对肺泡内的水的转运和黏膜下腺泡的黏液分泌起着重要的作用。COPD 气道黏液高分泌中黏蛋白 MUC5AC 表达明显增高,AQP5 表达降低。体内及体外实验研究证实抑制 AQP5 表达,可导致 MUC5AC 表达明显增多^[11-12]。

金水六君煎出自《景岳全书》,其主治肺肾虚寒,水泛为痰,或年迈阴虚、气血不足外受风寒,咳嗽呕恶多痰,喘急等证。其组方由二陈汤(半夏,陈皮,茯苓,甘草)及贞元饮(熟地黄,当归,炙甘草)组合而

成,方中当归、熟地黄滋肺肾阴血以治本,二陈汤燥湿化痰以治标,全方标本兼治^[13]。

目前用于黏液高分泌的细胞模型主要有黏液上皮细胞癌细胞株 NCI-H292、人肺腺癌细胞株 A549、人原代支气管上皮细胞 NHBE。A549 因具有黏液合成分泌的特性、稳定性高、易于培养和传代等优点,已广泛用于气道黏液高分泌体外研究^[14-15]。人中性粒弹性蛋白酶(HNE)主要由中性粒细胞释放,是一种高效的黏液促分泌剂,能更好模拟体内环境。本研究采用人中性粒弹性蛋白酶诱导 A549 细胞 24 h 建立体外黏液高分泌细胞模型,模型组细胞 MUC5AC 基因与蛋白表达较空白组均显著升高,AQP5 基因与蛋白表达较空白组均显著降低,与体内气道黏液高分泌病理模型相一致^[16]。与模型组比较,金水六君煎组及养阴组主要在转录水平下调 A549 细胞 MUC5AC mRNA 表达,上调 AQP5 mRNA 表达。化痰组主要在翻译水平下调细胞 MUC5AC 蛋白表达,上调 AQP5 蛋白表达,提示金水六君煎不同成分之间具有不同的作用靶点。王志旺等^[17-18]建立阴虚哮喘小鼠模型研究当归平喘作用,发现当归能促进小鼠肺组织 AQP5 表达,抑制 MUC5AC 的表达,通过调节肺组织水液代谢发挥平喘作用。邓青南、周建龙等^[19-20]研究发现高浓度半夏提取物能通过抑制 MUC5AC 表达,上调 AQP5 表达抑制大鼠气道黏液高分泌状态。当归养阴润燥、半夏燥湿化痰可能是金水六君煎治疗气道黏液高分泌主要药效成分。

研究结果显示模型组细胞培养液中 MUC5AC 及 AQP5 蛋白表达较空白组无明显差异,提示黏蛋白、水通道蛋白合成及分泌过程并非成一致性改变。有研究认为人中性粒弹性蛋白酶诱导黏蛋白分泌至细胞外需激活蛋白酶激活受体 2(PAR2)及蛋白激酶 C(PKC)^[21]。与模型组比较,金水六君煎组及养阴组培养液中 AQP5 明显增加,提示养阴成分可促进 AQP5 分泌至胞外,可解释金水六君煎组及养阴组细胞 AQP5 基因与蛋白水平表达不一致的原因,但具体机制还需要进一步研究。

综上,金水六君煎及其拆方含药血清可通过上调 AQP5 和抑制 MUC5AC 表达,改善 HNE 诱导的

细胞黏液高分泌状态,为临床金水六君煎治疗 COPD 黏液高分泌提供临床指导。但金水六君煎及其拆方调控黏蛋白 MUC5AC、水通道蛋白 AQP5 基因与蛋白表达的信号通路及 MUC5AC 与 AQP5 相互作用机制还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 武 婵,柏正平.柏正平教授运用补肺肾膏治疗 COPD 稳定期临床经验[J].湖南中医药大学学报,2017,37(10):1100-1102.
- [2] 王 可,冯玉麟,文富强,等.慢性阻塞性肺疾病患者气道上皮水通道 5 的表达与黏液高分泌[J].中国呼吸与危重监护杂志,2006,5(5):357-361.
- [3] 许艺芝.金水六君煎加味治疗肺肾阴虚型慢性支气管炎迁延期临床研究[J].中医临床研究,2012,04(16):85-86.
- [4] 万佳婧.加味金水六君煎治疗嗜酸性粒细胞性支气管炎肾阴亏型的临床疗效观察[D].长沙:湖南中医药大学,2017.
- [5] 张文江,苗 青,张 琼,等.金水六君煎加味治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期的临床观察[J].中国中医急症,2014,23(10):1836-1838.
- [6] 孟 辉,黎俏梅,沈英森,等.金水六君煎及其成分祛痰作用的药效学研究[J].中成药,2005,27(7):849-850.
- [7] 张 宏,王旭昉,刘美奇,等.中药含药血清实验动物灌胃给药剂量探讨[J].吉林中医药,2015,35(6):623-625.
- [8] 王洪武,倪 青,林 兰.中药含药血清的研究进展及其在中医学中的应用[J].北京中医药,2008,27(9):698-701.
- [9] 兰 箭,孙 航,刘 杞,等.人中性粒细胞弹性蛋白酶诱导气道黏液高分泌细胞模型的建立及其机制的初步研究[J].中国生物工程杂志,2008,28(3):1-7.
- [10] 田攀文,文富强.治疗慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌临床意义[J].中国实用内科杂志,2015,35(5):382-385.
- [11] 沈 瑶.水通道蛋白 5 敲除对呼吸道粘液表达谱的影响及其信号转导机制的研究[D].上海:复旦大学,2010.
- [12] 沈 瑶,白春学,陈智鸿.水通道蛋白 5 对 PMA 诱导的原代小鼠气道上皮细胞 MUC5AC 合成的影响[J].复旦学报(医学版),2012,39(3):225-230.
- [13] 张俊图,吴洪波,李建梅.金水六君煎方用探讨[J].江西中医药,2015,46(4):5-7.
- [14] 雷蕊霞,周向东.血红素加氧酶-1 抑制香烟烟雾提取物致体外人肺 A549 细胞黏液高分泌[J].基础医学与临床,2010,30(3):246-251.
- [15] 文秀芳,周向东.肝素抑制佛波酯诱导 A549 表达黏蛋白 5AC 和表皮生长因子受体活性的研究[J].中国实用内科杂志,2008,28(12):1076-1077.
- [16] 钟相根,李宇航,贾 旭,等.“通利大肠”对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道黏液高分泌的影响[J].北京中医药大学学报,2010,33(12):809-812.
- [17] 王志旺,刘雪枫,程小丽,等.当归对阴虚哮喘小鼠的平喘作用及肺组织中水通道蛋白 5 表达的影响[J].华西药理学杂志,2016,31(3):235-238.
- [18] 王志旺,程小丽,任 远,等.当归对阴虚哮喘小鼠气道 MUC5AC 及相关炎症因子表达的影响[J].中国免疫学杂志,2016,32(1):42-45.
- [19] 周建龙,邓青南,梁 静,等.半夏提取物对小鼠肺水通道蛋白 5 表达的影响[J].长春中医药大学学报,2015,31(2):229-231.
- [20] 周建龙.半夏提取物对慢性气道黏液高分泌的影响[D].广州:广州中医药大学,2009.
- [21] 周 佳,周向东,许 瑞,等.蛋白酶激活受体 2 在人中性粒细胞弹性蛋白酶诱发气道黏液速发式分泌中的作用及机制[J].华中科技大学学报(医学版),2015,44(6):634-639.

(本文编辑 苏 维)