

## 论 著

金水六君煎对慢性阻塞性肺疾病小鼠  
气道黏液潴留的影响及机制研究张 真<sup>1</sup>, 杨亿然<sup>1</sup>, 王 慧<sup>1</sup>, 李剑庆<sup>1</sup>, 李爱平<sup>1</sup>, 柏正平<sup>2</sup>, 刘 雨<sup>3</sup>(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410006;  
3. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙 410006)

**[摘要]** **目的** 探讨金水六君煎对慢性阻塞性肺疾病(COPD)小鼠气道黏液潴留的影响及其可能机制。**方法** 将72只C57BL/6小鼠随机分为空白组、COPD组、金水六君煎低剂量组、金水六君煎中剂量组、金水六君煎高剂量组和罗氟司特组,每组12只。除空白组外,其余组采用鼻腔滴注脂多糖加烟熏的方法建立COPD模型。成模后,金水六君煎低、中、高剂量组分别给予3.705 g/(kg·d)、7.41 g/(kg·d)、14.82 g/(kg·d)金水六君煎液灌胃,罗氟司特组给予65 μg/(kg·d)罗氟司特灌胃,空白组和COPD组给予等量生理盐水灌胃,均1次/d,连续14 d。灌胃结束后,采用小动物肺功能仪测定各组小鼠每分钟通气量(MV)、呼气峰值流速(PEF)和吸气峰值流速(PIF),HE染色半定量评估肺组织炎症,PAS染色观察气道黏液分泌和杯状细胞增生情况,比色法检测肺泡灌洗液中唾液酸、尿素含量,并计算两者比值,ELISA法检测肺组织中环腺苷酸(cAMP)和V-ATP酶含量及肺泡灌洗液中黏蛋白5ac(Muc5ac)含量,qRT-PCR和Western blot法分别检测肺组织中囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)、Foxi1 mRNA和蛋白表达情况。**结果** 与空白组比较,COPD组的MV、PEF、PIF、尿素含量、cAMP和V-ATP酶含量及CFTR、Foxi1 mRNA和蛋白相对表达量均明显降低( $P$ 均 $<0.05$ ),肺组织病理评分、气道阳性着色面积占比和唾液酸、Muc5ac含量及唾液酸/尿素均明显升高( $P$ 均 $<0.05$ )。与COPD组比较,金水六君煎各组(除金水六君煎低剂量组cAMP外)和罗氟司特组的MV、PEF、PIF、尿素含量、cAMP和V-ATP酶含量及CFTR、Foxi1 mRNA和蛋白相对表达量均明显升高( $P$ 均 $<0.05$ ),肺组织病理评分、气道阳性着色面积占比和唾液酸、Muc5ac含量及唾液酸/尿素均明显降低( $P$ 均 $<0.05$ )。**结论** 金水六君煎可改善COPD小鼠气道黏液潴留,其机制可能与调控CFTR和Foxi1表达有关。

**[关键词]** 金水六君煎;慢性阻塞性肺疾病;气道黏液潴留;囊性纤维化跨膜转导调节因子;Foxi1;罗氟司特

doi: 10.3969/j.issn.1008-8849.2023.13.001

**[中图分类号]** R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8849(2023)13-1753-09**Effect and mechanism of Jinshui Liujun decoction on airway mucus retention in COPD mice**ZHANG Zhen<sup>1</sup>, YANG Yiran<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, LI Jianqing<sup>1</sup>, LI Aiping<sup>1</sup>, BAI Zhengping<sup>2</sup>, LIU Yu<sup>3</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China; 2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China; 3. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China)

**Abstract:** **Objective** It is to explore the effect and possible mechanism of Jinshui Liujun decoction on airway mucus retention in mice with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Seventy-two C57BL/6 mice were randomly divided into blank group, COPD group, low dose group of Jinshui Liujun decoction, medium dose group of Jinshui Liujun decoction, high dose group of Jinshui Liujun decoction and Roflumilast group. The blank group and COPD group were given equal volume of physiological saline gavage, 1 time/d, for 14 d. After gavage, the animal lung function instrument was used to measure the minute ventilation (MV), expiratory peak flow (PEF) and inspiratory peak flow (PIF) of each group of mice. HE staining was used to evaluate the inflammation of lung tissue semi-quantitatively. PAS staining was used to observe the secretion of airway mucus and the proliferation of goblet cells. The ratio of sialic acid and urea was calculated by colorimetric method. The cAMP and V-ATPase content in lung tissue were detected by ELISA method. The mucin 5ac (Muc5ac) content in alveolar lavage fluid was detected by Western blot method. The expression of CFTR, Foxi1 mRNA and protein in lung tissue were detected by qRT-PCR and Western blot method respectively. **Results** Compared with the blank group, the MV, PEF, PIF, urea content, cAMP and V-ATPase content and CFTR, Foxi1 mRNA and protein relative expression of COPD group were significantly lower ( $P$  all  $<0.05$ ). The lung tissue pathology score, airway positive staining area ratio and sialic acid, Muc5ac content and sialic acid/urea were significantly higher ( $P$  all  $<0.05$ ). Compared with the COPD group, the MV, PEF, PIF, urea content, cAMP and V-ATPase content and CFTR, Foxi1 mRNA and protein relative expression of each group of Jinshui Liujun decoction (except the low dose group of Jinshui Liujun decoction cAMP) and Roflumilast group were significantly higher ( $P$  all  $<0.05$ ). The lung tissue pathology score, airway positive staining area ratio and sialic acid, Muc5ac content and sialic acid/urea were significantly lower ( $P$  all  $<0.05$ ). **Conclusion** Jinshui Liujun decoction can improve airway mucus retention in COPD mice, and its mechanism may be related to the regulation of CFTR and Foxi1 expression.

**[作者简介]** 张真,男,硕士,研究方向为中医药防治呼吸系统疾病。

**[通信作者]** 刘雨, E-mail: 861141866@qq.com

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82004306)

jun decoction, high dose group of Jinshui Liujun decoction, and roflukast group, with 12 mice in each group. All the mice in each group except for the blank group were given lipopolysaccharide by nasal drip plus smoking to established COPD models. After modeling, the low, medium, and high dose groups of Jinshui Liujun decoction were respectively given 3.705 g/(kg·d), 7.41 g/(kg·d), and 14.82 g/(kg·d) Jinshui Liujun decoction solution by gavage, while the roflukast group was given 65 μg/(kg·d) roflukast by gavage, the blank group and COPD group were given an equal amount of physiological saline by gavage, all once daily, continuously treated for 14 days. After treatment, the minute ventilation volume (MV), peak expiratory flow (PEF) and peak inspiratory flow (PIF) of the mice in each group were detected by a small animal lung function instrument, the lung tissue inflammation was semi quantitatively evaluated by HE staining, the airway mucus secretion and goblet cell proliferation were observed by PAS staining, and the contents of sialic acid and urea in alveolar lavage fluid were measured by colorimetry, and their ratio was calculated, the contents of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and V-ATPase in lung tissue, as well as the content of mucin 5ac (Muc5ac) in alveolar lavage fluid were measured by ELISA, the mRNA and protein expressions of cystic fibrosis transmembrane transduction regulatory factor (CFTR) and forkhead box protein i1 (Foxi1) in lung tissue were respectively detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** Compared with the blank group, the MV, PEF, PIF, contents of urea, cAMP, V-ATPase, as well as the relative expressions of CFTR, Foxi1 mRNA and protein in the COPD group were significantly reduced (all  $P < 0.05$ ), while the lung tissue pathological score, proportion of positive airway staining area, the contents of sialic acid, Muc5ac, and sialic acid/urea were significantly increased (all  $P < 0.05$ ). Compared with the COPD group, the MV, PEF, PIF, contents of urea, cAMP, V-ATPase, as well as the relative expressions of CFTR, Foxi1 mRNA and protein in the COPD group were significantly increased (all  $P < 0.05$ ), while the lung tissue pathological score, proportion of positive airway staining area, the contents of sialic acid, Muc5ac, and sialic acid/urea were significantly decreased (all  $P < 0.05$ ) in each Jinshui Liujun decoction groups (except for cAMP in the low dose group of Jinshui Liujun decoction) and roflukast group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Jinshui Liujun decoction can improve airway mucus retention in COPD mice, and its internal mechanism may be related to the regulation of CFTR and Foxi1.

**Keywords:** Jinshui Liujun decoction; chronic obstructive pulmonary disease; airway mucus retention; cystic fibrosis transmembrane transduction regulatory factor; Foxi1; roflumilast

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是全球第四大死因,预计到2030年将成为第三大死因<sup>[1]</sup>。2018年,王辰院士牵头的“中国成人肺部健康研究”调查结果显示,我国20岁及以上成人COPD患病率为8.6%,40岁以上人群患病率高达13.7%,估算我国患者数近1亿<sup>[2]</sup>。COPD特征是不可逆性的气流受限,其发病与环境 and 遗传因素有关,吸烟是主要的危险因素,深入研究其病理生理学机制将对COPD的个体化治疗有重大意义。气道黏液潴留是COPD的重要形态学基础<sup>[3-6]</sup>。囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)是一种环腺苷酸(cAMP)依赖的ATP门控性Cl<sup>-</sup>通道,对气道液体运输和黏液浓度至关重要,与气道慢性炎症及黏液潴留密切相关,CFTR的间接增效剂-罗氟司特治疗COPD患者疗效较好,并成功在欧美等地上市<sup>[7]</sup>。肺离子细胞是近期发现的一种气道新的细胞类型,CFTR被证实在肺离子细胞中大量表达,破坏促肺离子细胞生成关键因子Foxi1可致CFTR表达丧失和气道黏液潴留<sup>[8-9]</sup>。金水六君煎出自《景岳全书》,临床上用于治疗

COPD咳嗽痰多疗效满意,药效学研究显示金水六君煎能显著增加气管液体分泌量,促进痰液排出<sup>[10]</sup>。本课题组前期研究亦表明,金水六君煎能明显抑制COPD大鼠黏蛋白5ac(Muc5ac)的表达,上调水通道蛋白5的表达,以促进气道黏液排出<sup>[11]</sup>。本实验以COPD小鼠为研究对象,观察了金水六君煎对气道黏液潴留的干预作用和对CFTR、Foxi1表达的影响,以进一步阐明金水六君煎治疗COPD的可能机制及靶点。

## 1 实验材料与方法

**1.1 实验动物** SPF级雄性C57BL/6小鼠72只,体重18~22g,由湖南中医药大学动物实验中心提供,生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004,质量合格证号:ZS-202203150021。饲养环境温度(24±2)℃,湿度50%~60%,昼夜12h交替照明,自由获取标准食物和水。动物实验经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准(LLBH-202201050001)。

**1.2 药物及金水六君煎药液制备** 罗氟司特(批号:155813)购自MedChemExpress(MCE)公司。根

据文献[12-13],确定金水六君煎原方剂量:当归 7.5 g、熟地黄 15 g、陈皮 5.5 g、半夏 7.5 g、茯苓 7.5 g、炙甘草 4 g、生姜 10 g,各中药饮片购自湖南省中医药研究院附属医院中药房,并经田其学主任药师鉴定确认。一煎按原药材量加入 10 倍水,煎煮 1 h 后过滤,二煎加入 8 倍量水,煎煮 1 h 后过滤,合并 2 次滤液,分别浓缩成 0.75 g/mL、1.5 g/mL、3.0 g/mL 的药液,并分装存于 4℃ 冰箱中备用。

**1.3 香烟和主要试剂** 金圣牌香烟,江西中烟工业有限责任公司生产,含焦油 8 mg、烟气烟碱 0.8 mg、CO 9 mg。脂多糖(LPS,批号:0000113255)购自 Millipore Sigma 公司;4% 多聚甲醛固定液(批号:22242687)购自北京兰捷柯科技有限公司;苏木素伊红染液(批号:03A220706)购自上海威奥生物科技有限公司;唾液酸试剂盒(批号:20220901)、尿素试剂盒(批号:20220825)购自南京建成生物工程研究所;cAMP ELISA 试剂盒(批号:08/2022)购自上海酶联生物有限公司;Muc5ac ELISA 试剂盒(批号:U22027015)购自武汉华美生物工程有限公司;V-ATPase ELISA 试剂盒(批号:Jul 2022)购自上海茁彩生物科技有限公司;小鼠单抗 CFTR(批号:00100501)、小鼠单抗  $\beta$ -actin(批号:10011066)购自美国 proteintech 公司;兔多抗 Foxi1(批号:A90915N)购自 Thermo Fisher 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠二抗(批号:02E220621)、HRP 标记羊抗兔二抗(批号:01C220617)购自中国 Abio-Well 公司;核酸染料(批号:P1622)购自北京普利莱公司;mRNA 反转录试剂盒(批号:10148)购自北京康为世纪公司。

**1.4 主要仪器** 1.6 m×0.5 m×0.25 m 亚克力透明烟熏箱(包含顶部和侧面 2 个直径 8 cm 的进出气孔),由上海易雕实业有限公司定制;LH-75 型管道风机(深圳市世化电器照明有限公司);PFT-MR 型肺功能检测仪(上海塔望智能科技有限公司);DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-24DN 型电泳槽、DYCZ-40D 型转膜仪(北京六一生物科技有限公司);ChemScope6100 型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);H1650R 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);QuantStudio1 型实时定量荧光 PCR 仪(美国应用生物系统公司);PW-812 型全自动酶标洗板机、MB-530 型多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司);DHP-500 型电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有

限公司);BA210T 型生物显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。

**1.5 实验方法** 小鼠适应性饲养 7 d 后,采用随机数字表法分为空白组、COPD 组、金水六君煎低剂量组、金水六君煎中剂量组、金水六君煎高剂量组、罗氟司特组,每组 12 只。除空白组外,余各组小鼠采用鼻腔滴注 LPS 加烟熏的方法建立 COPD 模型<sup>[14]</sup>,即在连接风机的自制烟熏箱中熏烟,2 次/d,每次 40 min,中途间隔 4 h,每次使用 20 支香烟,每熏烟 6 d 休息 1 d,共计 60 d。除空白组使用生理盐水滴鼻外,余各组在第 1 天和第 14 天使用 LPS 滴鼻,每只小鼠 0.6  $\mu$ g/ $\mu$ L,均在麻醉状态下进行,当日不烟熏。小鼠给药剂量参考人和动物体表面积折算的等效剂量比率表<sup>[15]</sup>,每只小鼠每千克体重给药量按人(70 kg)的等效量为中剂量,0.5 倍等效量为低剂量,2 倍等效量为高剂量,换算出小鼠金水六君煎低、中、高剂量分别为 3.705 g/(kg·d)、7.41 g/(kg·d)、14.82 g/(kg·d),罗氟司特按照 65  $\mu$ g/(kg·d)的剂量给予<sup>[16]</sup>。于实验第 61 天开始,空白组和 COPD 组给予等量生理盐水灌胃,其他组给予相应剂量药物灌胃,均 1 次/d,连续 14 d。

## 1.6 检测指标及方法

**1.6.1 肺功能** 小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,分离暴露气管,进行气管插管固定,使用小动物肺功能检测仪测定每分钟通气量(MV)、呼气峰值流速(PEF)和吸气峰值流速(PIF)。

**1.6.2 肺组织病理形态** 取小鼠左肺组织,于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,干燥脱水,石蜡包埋切片,HE 染色观察病理形态。根据文献[17]方法,对肺泡结构、肺上皮细胞、管腔情况和炎性细胞浸润 4 项指标进行肺组织病理半定量评分,按照病变情况评分 0~3 分,无病变为 0 分、轻度病变为 1 分、中度病变为 2 分、重度病变为 3 分,累加各项评分的总分作为病理评分。每只小鼠取 5 个视野的评分均值作为最终结果。PAS 染色观察气道黏液及杯状细胞,Image J(v1.53)软件测定阳性着色面积与气道管壁总面积的比值,每只小鼠选取 5 个支气管的测量数据均值作为最终结果。

**1.6.3 肺泡灌洗液中唾液酸、尿素和 Muc5ac 含量** 小鼠脱颈处死后,立即取出完整肺组织,血管夹夹闭左主支气管,使用 0.5 mL PBS 溶液灌洗右肺 3 次,每次反复抽吸 2 次,回收率超过 80%,4℃ 1 000 r/min

离心 10 min, 收集上清液, 放置在  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中保存备用。参考 Esther 等<sup>[18]</sup> 的方法, 取部分肺泡灌洗液配制成含有 1% 浓度的甲酸溶液, 并在  $80^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h, 再利用比色法检测各组肺泡灌洗液中唾液酸的含量, 尿素选取未处理的肺泡灌洗液检测, 最后计算两者的比值。肺泡灌洗液中 Muc5ac 含量严格按 ELISA 说明书操作检测。

**1.6.4 肺组织中 cAMP 和 V-ATP 酶含量** 称取小鼠肺组织 100 mg, 剪碎后放入组织研磨器(匀浆管)中, 然后加入 1 mL  $1 \times$  PBS 溶液, 制成匀浆, 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  过夜。经反复冻融 2 次破坏细胞膜,  $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$  下 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液备用。严格

按照 ELISA 试剂盒说明书检测 cAMP 和 V-ATP 酶含量。

**1.6.5 肺组织中 CFTR 和 Foxi1 mRNA 表达情况** 使用 Trizol 试剂从小鼠肺组织中提取总 RNA, 紫外分光光度计测定其浓度与纯度。使用 mRNA 反转录试剂盒将总 mRNA 转换为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR, 体系 30  $\mu\text{L}$ , 预变性条件:  $95^{\circ}\text{C}$  10 min, 循环条件:  $95^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 40 次循环。以  $\beta$ -actin 为内参, 空白组为对照, 计算  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ , 得到目的基因 mRNA 的相对表达量。在 NCBI 上搜索目的基因的序列, 运用 primer5 软件设计引物, 由北京擎科合成引物, 见表 1。

表 1 基因引物序列

基因	上游引物序列	下游引物序列	长度/bp
CFTR	5' - CGTTCCATTGCCATTACC - 3'	5' - GGGTGAAGAAGCAGTGTCC	71
Foxi1	5' - AGGAGTCCAGCCCAAATA - 3'	5' - GCTGAGCCACCACATCTT - 3'	224
$\beta$ -actin	5' - ACATCCGTAAGACCTCTATGCC - 3'	5' - TACTCCTGCTTGCTGATCCAC - 3'	223

**1.6.6 肺组织中 CFTR 和 Foxi1 蛋白表达情况** 采用 Western blot 法检测: 称取 25 mg 肺组织, 加入 300  $\mu\text{L}$  RIPA 裂解液, 在生物样品均质仪中研磨为组织匀浆, 冰上裂解 10 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 提取上清液, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。配置 SDS-PAGE 凝胶, 电泳, 转膜, 封闭, 一抗稀释(CFTR 1:1 000、Foxi1 1:500、 $\beta$ -actin 1:5 000), 与膜  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 次日室温放置 30 min,  $1 \times$  PBST 洗膜 3 次, 每次 15 min。二抗稀释(1:5 000), 与膜共同室温孵育 90 min,  $1 \times$  PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。ECL 化学发光显影, 凝胶成像系统成像。Image J(v1.53) 软件测定各条带光密度值, 以目的条带光密度值比  $\beta$ -actin 条带光密度值代表该蛋白的相对含量。

**1.7 统计学方法** 运用 SPSS 25.0 软件进行数据

统计分析, 计量数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 若不服从正态分布或方差不齐时, 采用 kruskal-wallis 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 各组小鼠肺功能指标比较** COPD 组的 MV、PEF、PIF 均明显低于空白组( $P$  均  $< 0.05$ )。金水六君煎各组组和罗氟司特组的 MV、PEF、PIF 均明显高于 COPD 组( $P$  均  $< 0.05$ ), 且金水六君煎高剂量组和罗氟司特组的 MV、PEF、PIF 均明显高于其他组( $P$  均  $< 0.05$ ), 金水六君煎高剂量组和罗氟司特组各指标比较差异均无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。见表 2。

**2.2 各组小鼠肺组织 HE 染色表现** 空白组小鼠

表 2 空白组和慢性阻塞性肺疾病各组小鼠肺功能指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	MV/mL	PEF/(mL/s)	PIF/(mL/s)
空白组	9	48.15 $\pm$ 2.39	2.51 $\pm$ 0.24	3.15 $\pm$ 0.28
COPD 组	7	25.09 $\pm$ 1.40 <sup>①</sup>	0.92 $\pm$ 0.22 <sup>①</sup>	1.43 $\pm$ 0.11 <sup>①</sup>
金水六君煎低剂量组	8	28.92 $\pm$ 1.58 <sup>②③④</sup>	1.20 $\pm$ 0.09 <sup>②③④</sup>	1.60 $\pm$ 0.09 <sup>②③④</sup>
金水六君煎中剂量组	8	34.01 $\pm$ 1.94 <sup>②③④⑤</sup>	1.54 $\pm$ 0.15 <sup>②③④⑤</sup>	1.83 $\pm$ 0.09 <sup>②③④⑤</sup>
金水六君煎高剂量组	9	38.40 $\pm$ 2.80 <sup>②</sup>	1.76 $\pm$ 0.10 <sup>②</sup>	2.29 $\pm$ 0.13 <sup>②</sup>
罗氟司特组	9	38.93 $\pm$ 1.12 <sup>②</sup>	1.72 $\pm$ 0.11 <sup>②</sup>	2.23 $\pm$ 0.10 <sup>②</sup>
<i>F</i>		139.16	90.61	134.72
<i>P</i>		$< 0.001$	$< 0.001$	0.001

注: ①与空白组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 COPD 组比较,  $P < 0.05$ ; ③与罗氟司特组比较,  $P < 0.05$ ; ④与金水六君煎高剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ⑤与金水六君煎低剂量组比较,  $P < 0.05$ 。

肺泡结构完整,少见肺泡萎缩、塌陷和融合,肺泡间隔无增厚和水肿,气道管腔内无脱落上皮细胞和炎性渗出物,黏膜上皮结构完整,管腔外无充血、水肿和炎性细胞浸润;COPD 组小鼠肺泡腔可见渗出,肺

泡间隔明显增厚和水肿,并伴有炎性细胞浸润,气道管腔内可见上皮细胞脱落,管壁增厚,管腔狭窄,局部塌陷,黏膜各层可见炎性细胞浸润;罗氟司特组和金水六君煎各组的上述病理改变较轻。见图 1。

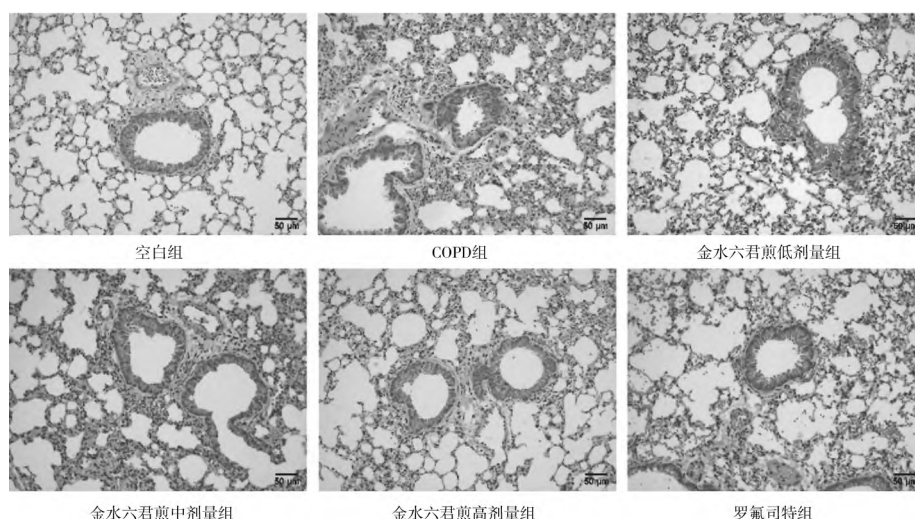


图1 空白组和慢性阻塞性肺疾病各组小鼠肺组织 HE 染色形态(×200)

**2.3** 各组小鼠气道黏液分泌和杯状细胞增生情况 PAS 染色可将黏蛋白染为紫红色,阳性染色主要见于气道黏膜表面、杯状细胞和黏膜下腺体。与空白

组比较,COPD 组小鼠气道有大量杯状细胞增生,金水六君煎各组 and 罗氟司特组的杯状细胞增生减轻,其中以罗氟司特组最为显著。见图 2。

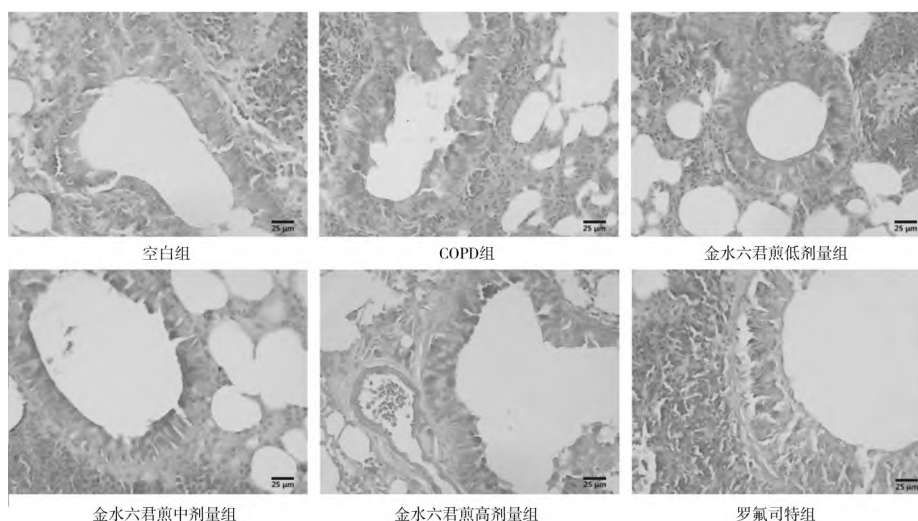


图2 空白组和慢性阻塞性肺疾病各组小鼠肺组织 PAS 染色表现(×400)

**2.4** 各组小鼠肺组织病理评分和气道阳性着色面积占比较 COPD 组的肺组织病理评分和气道阳性着色面积占比均明显高于空白组( $P$  均  $< 0.05$ )。金水六君煎各组 and 罗氟司特组的肺组织病理评分和气道阳性着色面积占比均明显低于 COPD 组( $P$  均  $< 0.05$ ),且金水六君煎高剂量组和罗氟司特组的肺组织病理评分和气道阳性着色面积占比均明显低于其他组( $P$  均  $< 0.05$ ),罗氟司特组气道阳性着色面积占比明显低于金水六君煎高剂量组( $P$  均  $< 0.05$ ),金水六君煎高剂量组和罗氟司特组肺组织

病理评分比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 3。

**2.5** 各组小鼠肺泡灌洗液中唾液酸、尿素和 Muc5ac 含量比较 与空白组比较,COPD 组的唾液酸和 Muc5ac 含量及唾液酸/尿素均明显升高( $P$  均  $< 0.05$ ),尿素含量明显降低( $P < 0.05$ )。与 COPD 组比较,金水六君煎各组 and 罗氟司特组的唾液酸和 Muc5ac 含量及唾液酸/尿素均明显降低( $P$  均  $< 0.05$ ),尿素含量均明显升高( $P$  均  $< 0.05$ );金水六君煎高剂量组和罗氟司特组各指标变化更为明显,

表3 空白组和慢性阻塞性肺疾病各组小鼠肺组织病理评分和气道阳性着色面积占比比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	肺组织病理评分/分	气道阳性着色面积占比/%
空白组	10	0.56 ± 0.27	5.89 ± 0.51
COPD 组	8	6.14 ± 1.13 <sup>①</sup>	42.80 ± 3.10 <sup>①</sup>
金水六君煎低剂量组	9	4.98 ± 1.47 <sup>②③④</sup>	40.63 ± 2.23 <sup>②③④</sup>
金水六君煎中剂量组	10	4.14 ± 0.93 <sup>②③④⑤</sup>	34.77 ± 2.03 <sup>②③④⑤</sup>
金水六君煎高剂量组	10	3.36 ± 1.20 <sup>②</sup>	24.97 ± 2.47 <sup>②③</sup>
罗氟司特组	10	3.52 ± 1.04 <sup>②</sup>	10.91 ± 1.56 <sup>②</sup>
F		50.37	428.75
P		<0.001	0.003

注: ①与空白组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 COPD 组比较,  $P < 0.05$ ; ③与罗氟司特组比较,  $P < 0.05$ ; ④与金水六君煎高剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ⑤与金水六君煎低剂量组比较,  $P < 0.05$ 。

与其他组比较差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ ), 但此 2 组间比较差异均无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ ); 金水六君煎低剂量组和金水六君煎中剂量

组唾液酸、尿素含量和唾液酸/尿素比较差异均无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ ), 但金水六君煎中剂量组中的 Muc5ac 含量明显低于金水六君煎低剂量组( $P < 0.05$ )。见表 4。

**2.6** 各组小鼠肺组织中 cAMP 和 V-ATP 酶含量比较 COPD 组的 cAMP 和 V-ATP 酶含量均明显低于空白组( $P$  均  $< 0.05$ )。除金水六君煎低剂量组的 cAMP 含量与 COPD 组比较差异无统计学意义外( $P > 0.05$ ), 金水六君煎各组 and 罗氟司特组的 cAMP 和 V-ATP 酶含量均明显高于 COPD 组( $P$  均  $< 0.05$ ), 且金水六君煎高剂量组和罗氟司特组的 cAMP 和 V-ATP 酶含量均明显高于其他组( $P$  均  $< 0.05$ ), 金水六君煎高剂量组和罗氟司特组 cAMP 含量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 但金水六君煎高剂量组的 V-ATP 酶含量明显高于罗氟司特组( $P < 0.05$ )。见表 5。

表4 空白组和慢性阻塞性肺疾病各组小鼠肺泡灌洗液中唾液酸、尿素、唾液酸/尿素和 Muc5ac 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	唾液酸/(mmol/L)	尿素/(mmol/L)	唾液酸/尿素	Muc5ac/(pg/mL)
空白组	10	1.39 ± 0.08	0.87 ± 0.03	1.59 ± 0.06	29.04 ± 8.29
COPD 组	8	2.09 ± 0.09 <sup>①</sup>	0.41 ± 0.10 <sup>①</sup>	5.05 ± 0.29 <sup>①</sup>	95.36 ± 5.89 <sup>①</sup>
金水六君煎低剂量组	9	1.85 ± 0.04 <sup>②③④</sup>	0.55 ± 0.09 <sup>②③④</sup>	3.39 ± 0.31 <sup>②③④</sup>	79.10 ± 7.74 <sup>②③④</sup>
金水六君煎中剂量组	10	1.81 ± 0.04 <sup>②③④</sup>	0.62 ± 0.04 <sup>②③④</sup>	2.95 ± 0.24 <sup>②③④</sup>	67.71 ± 6.92 <sup>②③④⑤</sup>
金水六君煎高剂量组	10	1.64 ± 0.07 <sup>②</sup>	0.68 ± 0.09 <sup>②</sup>	2.44 ± 0.36 <sup>②</sup>	56.98 ± 4.53 <sup>②</sup>
罗氟司特组	10	1.65 ± 0.05 <sup>②</sup>	0.71 ± 0.04 <sup>②</sup>	2.31 ± 0.09 <sup>②</sup>	51.77 ± 6.41 <sup>②</sup>
F		121.75	73.64	178.33	93.01
P		0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: ①与空白组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 COPD 组比较,  $P < 0.05$ ; ③与罗氟司特组比较,  $P < 0.05$ ; ④与金水六君煎高剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ⑤与金水六君煎低剂量组比较,  $P < 0.05$ 。

表5 空白组和慢性阻塞性肺疾病各组小鼠肺组织中 cAMP 和 V-ATP 酶含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	cAMP/(pmol/mL)	V-ATP 酶/(μmol/mL)
空白组	10	17.42 ± 1.66	6.69 ± 0.69
COPD 组	8	9.23 ± 1.05 <sup>①</sup>	2.55 ± 0.24 <sup>①</sup>
金水六君煎低剂量组	9	9.86 ± 1.31 <sup>③④</sup>	3.07 ± 0.26 <sup>②③④</sup>
金水六君煎中剂量组	10	13.00 ± 1.08 <sup>②③④⑤</sup>	3.75 ± 0.18 <sup>②③④⑤</sup>
金水六君煎高剂量组	10	14.73 ± 0.96 <sup>②</sup>	5.21 ± 0.30 <sup>②③</sup>
罗氟司特组	10	15.87 ± 1.60 <sup>②</sup>	4.43 ± 0.42 <sup>②</sup>
F		51.087	141.56
P		<0.001	<0.001

注: ①与空白组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 COPD 组比较,  $P < 0.05$ ; ③与罗氟司特组比较,  $P < 0.05$ ; ④与金水六君煎高剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ⑤与金水六君煎低剂量组比较,  $P < 0.05$ 。

**2.7** 各组小鼠肺组织中 CFTR、Foxi1 mRNA 和蛋白表达情况比较 COPD 组的 CFTR、Foxi1 mRNA 和

蛋白相对表达量均明显低于空白组( $P$  均  $< 0.05$ )。金水六君煎各组 and 罗氟司特组的 CFTR、Foxi1 mRNA 和蛋白相对表达量均明显高于 COPD 组( $P$  均  $< 0.05$ ), 且金水六君煎高剂量组和罗氟司特组的 CFTR、Foxi1 mRNA 和蛋白相对表达量均明显高于其他组( $P$  均  $< 0.05$ ); 金水六君煎高剂量组的 CFTR、Foxi1 蛋白相对表达量与罗氟司特组比较差异均无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ ), CFTR、Foxi1 mRNA 相对表达量均明显高于罗氟司特组( $P$  均  $< 0.05$ )。见图 3 及表 6。

### 3 讨论

COPD 归属于中医“肺胀”“喘证”等范畴, 其病位在肺, 继则影响脾、肾, 病性多属本虚标实, 痰饮始终是 COPD 的核心病机。肺主通调水道, 通过宣发和肃降对水液的输布、运行和排泄进行调节, 痰饮的

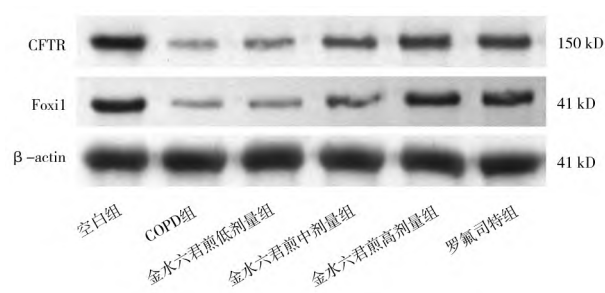


图3 空白组和慢性阻塞性肺疾病各组小鼠肺组织中 CFTR、Foxi1 蛋白表达条带

表6 空白组和慢性阻塞性肺疾病各组小鼠肺组织中 CFTR、Foxi1 mRNA 和蛋白相对表达量比较(  $\bar{x} \pm s$  )

组别	只数	CFTR		Foxi1	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
空白组	10	1.11 ± 0.09	0.66 ± 0.04	5.55 ± 0.35	0.66 ± 0.04
COPD 组	8	0.14 ± 0.02 <sup>①</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>①</sup>	1.06 ± 0.16 <sup>①</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>①</sup>
金水六君煎低剂量组	9	0.30 ± 0.03 <sup>②③④</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>②③④</sup>	1.56 ± 0.20 <sup>②③④</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>②③④</sup>
金水六君煎中剂量组	10	0.47 ± 0.04 <sup>②③④⑤</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>②③④⑤</sup>	2.48 ± 0.35 <sup>②③④⑤</sup>	0.36 ± 0.01 <sup>②③④⑤</sup>
金水六君煎高剂量组	10	0.82 ± 0.06 <sup>②③</sup>	0.52 ± 0.03 <sup>②</sup>	3.86 ± 0.29 <sup>②③</sup>	0.56 ± 0.03 <sup>②</sup>
罗氟司特组	10	0.62 ± 0.04 <sup>②</sup>	0.50 ± 0.03 <sup>②</sup>	2.85 ± 0.17 <sup>②</sup>	0.53 ± 0.01 <sup>②</sup>
F		501.13	469.91	306.81	599.41
P		<0.001	0.002	<0.001	<0.001

注: ①与空白组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 COPD 组比较,  $P < 0.05$ ; ③与罗氟司特组比较,  $P < 0.05$ ; ④与金水六君煎高剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ⑤与金水六君煎低剂量组比较,  $P < 0.05$ 。

等于纤毛的高度(约 7 μm),黏液层则覆盖在纤毛表面,纤毛周围层充当有效的润滑层,促使黏液层在纤毛的摆动下向咽部移动<sup>[19-21]</sup>。但在 COPD 患者中,气道表面层的水合不足和(或)黏蛋白分泌过多,纤毛周围层降低,黏液的黏弹性、黏附性和润湿性等物理性质发生改变<sup>[22]</sup>,从而潴留在气道表面难以咳出,诱发感染、炎症、气流阻塞和肺功能下降。一直以来,测量黏液浓度是一种反映气道水合状态的重要方法,但实际操作存在诸多困难。因此,本研究采用了一种替代方式<sup>[18]</sup>,以唾液酸来反映气道表面层中黏蛋白的含量,以尿素作为气道表面液相的标志物,两者比值即可反映黏液浓度。本实验结果显示,COPD 小鼠的肺功能各项指标下降,肺组织炎症评分升高,气道管壁增厚,杯状细胞增生,唾液酸、唾液酸/尿素和 Muc5ac 含量升高,尿素含量降低,提示气道表面层水合不足和黏液高分泌,存在肺部炎症和黏液潴留。而金水六君煎各组 and 罗氟司特组的以上指标均有改善,提示气道表面层水合增加,黏蛋白分泌减少,肺部炎症和黏液潴留减轻。

CFTR 是一种 cAMP 依赖的 ATP 门控性 Cl<sup>-</sup> 通道。当 CFTR 被激活时,Cl<sup>-</sup> 会被分泌到气道腔中,

形成与肺内水道失于通调,水津失布有关,正如《医学正传》言“津液粘稠,为痰为饮。”金水六君煎出自明代张景岳《景岳全书》“新方八阵·和阵”之首剂,其组方由二陈汤加熟地、当归而成,既可化痰理气,又可补肾养阴,全方标本兼顾,实有增水行痰之功效。

健康的气道表面被覆着一薄层黏液,即气道表面层,包括低黏度的纤毛周围层和覆盖在纤毛表面的黏液层<sup>[19]</sup>。正常情况下,纤毛周围层的高度大约

管腔表面增加的盐浓度将产生渗透驱动力,促使水被动地通过水通道蛋白或细胞旁途径进入气道,以补充气道表面层的水合<sup>[23]</sup>,从而促进黏液顺利排出。在本研究中,COPD 组小鼠肺组织中 CFTR mRNA 和蛋白表达明显降低,并存在气道黏液潴留、肺部炎症和肺功能下降。多项研究亦表明<sup>[24-26]</sup>,COPD 患者或动物模型中的 CFTR 获得性缺陷是导致气道黏液潴留和肺功能下降的重要原因,与本研究相一致。罗氟司特是首个成功在欧美等地上市用于治疗 COPD 的磷酸二酯酶 4(PDE-4) 抑制剂,其可通过抑制 PDE-4 来增加 cAMP 的浓度,进而增强 CFTR 的磷酸化以促进其开放。既往研究表明,罗氟司特不仅能逆转 CFTR 活性的降低,还可促进 CFTR mRNA 的表达,以增加气道上皮气道表面层的水合<sup>[27-29]</sup>,与本研究结果相一致。金水六君煎各组小鼠肺组织中的 cAMP 浓度升高,CFTR mRNA 和蛋白表达增加。既往药理研究表明,陈皮中的主要药效成分包括橙皮苷<sup>[30]</sup>、柚皮苷<sup>[31]</sup>、川陈皮素<sup>[32]</sup> 和橘皮素<sup>[33]</sup> 等黄酮类化合物均能直接或间接地激活 CFTR 的功能和表达,引发黏膜表面 Cl<sup>-</sup> 电流变化。据此推测,金水六君煎改善气道黏液潴留的机制可

能与增加 cAMP 浓度和促进 CFTR 表达有关,方中陈皮可能是主要的药效成分。

肺离子细胞是近年来通过单细胞 RNA 测序技术发现的一种罕见气道细胞类型,仅占小鼠气道细胞总数的 0.42%,却表达了超过 50% 的 CFTR,而数目众多的纤毛细胞在稳态时只表达其中的 1.5%<sup>[8]</sup>。并且这种新型肺细胞还共表达 Foxi1、V-ATP 酶的多个亚基和 CFTR,其中 Foxi1 属于叉头转录因子家族,其特征在于独特的叉头结构域<sup>[34]</sup>。相关研究表明,Foxi1 是肺离子细胞的关键驱动因子,敲除小鼠肺离子细胞中的 Foxi1 会导致 CFTR 表达丧失及气道黏液生理破坏,表现出囊性纤维化的特征<sup>[9]</sup>。V-ATP 酶是一种依赖于 ATP 的质子泵,广泛存在于真核细胞的胞膜系统中,涉及膜运输、溶酶体蛋白降解、微生物清除和离子的二次转运等细胞过程<sup>[35]</sup>。V-ATP 酶可通过稳定溶酶体膜来维持溶酶体活性,以对抗氧化应激,具有减轻肺损伤的作用<sup>[36]</sup>。现有研究已经确定<sup>[9,34,37-38]</sup>,V-ATP 酶受到 Foxi1 的调控,包括正确组装和驱动表达等多种形式。综上可知,Foxi1 基因是肺离子细胞转录程序的核心,CFTR 和 V-ATP 酶受到 Foxi1 的调控。本实验结果显示,COPD 小鼠的 Foxi1、CFTR 表达和 V-ATP 酶含量均减少,金水六君煎各组 and 罗氟司特组的 Foxi1、CFTR 表达和 V-ATP 酶含量增加,提示 Foxi1 的减少是导致 COPD 小鼠 CFTR 表达和 V-ATP 酶减少的可能原因,而金水六君煎和罗氟司特促进 CFTR 表达和增加 V-ATP 酶含量可能与 Foxi1 有关。本实验初步证实金水六君煎可促进 CFTR 表达,改善气道水合状态,减轻肺部炎症和气道黏液滞留,并延缓其肺功能下降,其内在机制可能与调控 Foxi1 有关,为金水六君煎治疗 COPD 提供了实验支持,但 COPD 中 CFTR 表达的降低和金水六君煎的干预作用是否涉及肺离子细胞还有待进一步研究。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

#### [参 考 文 献]

- [1] World Health Organization. Projections of mortality and causes of death,2015 and 2030 [EB/OL]. [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/projections/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/).
- [2] Wang C,Xu J,Yang L,et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China ( the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. Lancet,2018,391( 10131): 1706 - 1717.
- [3] Fahy J V,Dickey B F. Airway mucus function and dysfunction [J]. N Engl J Med,2010,363( 23): 2233 - 2247.
- [4] Kim V,Evans C M,Dickey B F. Dawn of a New Era in the Diagnosis and Treatment of Airway Mucus Dysfunction [J]. Am J Respir Crit Care Med,2019,199( 2): 133 - 134.
- [5] Zhou-Suckow Z,Duerr J,Hagner M,et al. Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases [J]. Cell Tissue Res,2017,367( 3): 537 - 550.
- [6] Lin V Y,Kaza N,Birket S E,et al. Excess mucus viscosity and airway dehydration impact COPD airway clearance [J]. Eur Respir J,2020,55( 1): 1900419.
- [7] Giembycz M A,Field S K. Roflumilast: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD [J]. Drug Des Devel Ther,2010,4: 147 - 158.
- [8] Montoro D T,Haber A L,Biton M,et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes [J]. Nature,2018,560( 7718): 319 - 324.
- [9] Plasschaert L W,Zilionis R,Choo-Wing R,et al. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte [J]. Nature,2018,560( 7718): 377 - 381.
- [10] 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.
- [11] 柏正平,刘雨,谭小宁,等. 金水六君煎拮抗地塞米松治疗慢性阻塞性肺病大鼠阴虚痰饮的实验研究 [J]. 中药药理与临床,2019,35( 3): 19 - 24.
- [12] 张介宾. 景岳全书 [M]. 上海: 第二军医大学出版社,2006: 1190.
- [13] 倪凤燕,陈莎,郭丛,等. 金水六君煎历史沿革和处方考证 [J]. 中国现代中药,2021,23( 5): 890 - 898.
- [14] Liu R,Wang P,Wu C,et al. Therapeutic effects of Hedysotis diffusa Willd in a COPD mouse model challenged with LPS and smoke [J]. Exp Ther Med,2018,15( 4): 3385 - 3391.
- [15] 章元沛. 药理学实验 [M]. 北京: 人民卫生出版社,1996: 238.
- [16] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组,中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南( 2021 年修订版) [J]. 中华结核和呼吸杂志,2021,44( 3): 170 - 205.
- [17] 周勇,余洋,程文涛,等. 虎杖苷对慢性阻塞性肺疾病

- 大鼠气道炎症及 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2019, 35( 2) : 35-40.
- [18] Esther C R, Hill D B, Button B, et al. Sialic acid-to-urea ratio as a measure of airway surface hydration [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 312( 3) : L398 - L404.
- [19] Button B, Cai L H, Ehre C, et al. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia [J]. Science, 2012, 337( 6097) : 937 - 941.
- [20] Tarran R, Grubb B R, Gatz J T, et al. The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition [J]. J Gen Physiol, 2001, 118( 2) : 223 - 236.
- [21] Lazarowski E R, Boucher R C. Purinergic receptors in airway hydration [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 187: 114387.
- [22] Bansil R, Turner B S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 124: 3 - 15.
- [23] Chambers L A, Rollins B M, Tarran R. Liquid movement across the surface epithelium of large airways [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2007, 159( 3) : 256 - 270.
- [24] Dransfield M T, Wilhelm A M, Flanagan B, et al. Acquired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction in the lower airways in COPD [J]. Chest, 2013, 144( 2) : 498 - 506.
- [25] Sloane P A, Shastry S, Wilhelm A, et al. A pharmacologic approach to acquired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction in smoking related lung disease [J]. PLoS One, 2012, 7( 6) : e39809.
- [26] Kaza N, Lin V Y, Stanford D, et al. Evaluation of a novel CFTR potentiator in COPD ferrets with acquired CFTR dysfunction [J]. Eur Respir J, 2022, 60( 1) : 2101581.
- [27] Baumlin N, Ivonnet P, Campos M A, et al. Roflumilast rescues smoke-induced mucociliary dysfunction in normal human bronchial epithelial cells in vitro [M] // C57. Together Forever: Airway Epithelial and Smooth Muscle Cells. American Thoracic Society, 2014: A4900.
- [28] Tyrrell J, Qian X, Freire J, et al. Roflumilast combined with adenosine increases mucosal hydration in human airway epithelial cultures after cigarette smoke exposure [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308( 10) : L1068 - L1077.
- [29] Schmid A, Baumlin N, Ivonnet P, et al. Roflumilast partially reverses smoke-induced mucociliary dysfunction [J]. Respir Res, 2015, 16: 135.
- [30] Azbell C, Zhang S, Skinner D, et al. Hesperidin stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride secretion and ciliary beat frequency in sinonasal epithelium [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2010, 143( 3) : 397 - 404.
- [31] Shi R, Xiao Z T, Zheng Y J, et al. Naringenin Regulates CFTR Activation and Expression in Airway Epithelial Cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44( 3) : 1146 - 1160.
- [32] 杨爽, 于波, 张耀方, 等. 川陈皮素对囊性纤维化跨膜传导调节因子的激活作用 [J]. 药学报, 2013, 48( 6) : 848 - 854.
- [33] Jiang Y, Yu B, Wang X, et al. Stimulation effect of wide type CFTR chloride channel by the naturally occurring flavonoid tangeretin [J]. Fitoterapia, 2014, 99: 284 - 291.
- [34] Quigley I K, Stubbs J L, Kintner C. Specification of ion transport cells in the *Xenopus* larval skin [J]. Development, 2011, 138( 4) : 705 - 714.
- [35] Eaton A F, Merkulova M, Brown D. The H( + )-ATPase ( V-ATPase) : from proton pump to signaling complex in health and disease [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2021, 320( 3) : C392 - C414.
- [36] Lee J U, Hong J, Shin H, et al. Overexpression of V-ATPase B2 attenuates lung injury/fibrosis by stabilizing lysosomal membrane permeabilization and increasing collagen degradation [J]. Exp Mol Med, 2022, 54( 5) : 662 - 672.
- [37] Vidarsson H, Westergren R, Heglin M, et al. The forkhead transcription factor Foxl1 is a master regulator of vacuolar H-ATPase proton pump subunits in the inner ear, kidney and epididymis [J]. PLoS One, 2009, 4( 2) : e4471.
- [38] Kui M, Pluznick J L, Zaidman N A. The transcription factor Foxl1 promotes expression of V-ATPase and Gpr116 in M-1 cells [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2023, 324( 3) : F267 - F273.

[收稿日期] 2023-01-16