

· 经典名方 ·

基于“肺主行水”理论探究小青龙汤调节肺水转运蛋白的作用机制

张迪¹, 张冬梅², 陆瑞敏¹, 吉静¹, 许宗颖¹, 王旭¹, 陈萌^{1*}

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

[摘要] 目的:观察小青龙汤及其方元对于肺水转运蛋白的调节作用,初步阐释“肺主行水”的生物学内涵,并从该角度探索其作用机制。方法:根据经方的组方规律,将小青龙汤(11.22 g·kg⁻¹)拆分为桂枝甘草(2.70 g·kg⁻¹)、芍药甘草(2.70 g·kg⁻¹)、姜辛味(3.90 g·kg⁻¹)、半夏麻黄(3.27 g·kg⁻¹) 4个方元。通过“形寒+饮冷+冷水浴”法建立寒饮蕴肺证大鼠病理模型,给予小青龙汤及其方元进行干预。肺功能分析系统测定大鼠用力肺活量(FVC)、功能残气量(FRC)、平均呼气中期流量(MMEF)、吸气时间(tI)和呼气时间(tE)等参数;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肺组织病理形态学改变;免疫组化法(IHC)检测大鼠肺组织中水通道蛋白(AQP)1、AQP5、上皮细胞钠通道 α 亚单位(α -ENaC)和钠钾泵(Na⁺-K⁺-ATPase)表达;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肺组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肺组织中环磷酸腺苷(cAMP)、蛋白激酶A(PKA)和cAMP反应元件结合蛋白(CREB)mRNA分子表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织中cAMP、PKA、CREB和磷酸化(p)-CREB蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠FVC、FRC和MMEF功能显著下降($P<0.01$),tI与tE时间明显延长($P<0.05$, $P<0.01$);肺组织中TNF- α 含量显著升高($P<0.01$);肺组织中cAMP、PKA、CREB mRNA及蛋白表达显著降低($P<0.01$);肺组织中AQP5及 α -ENaC表达明显减少;大鼠肺泡腔内充满水肿液,周围组织充血,炎性细胞浸润,支气管黏膜上皮黏连。与模型组比较,小青龙汤及其方元组可以明显增强模型大鼠FVC、FRC与MMEF功能($P<0.05$, $P<0.01$),部分方元组可缩短tI与tE时间($P<0.05$, $P<0.01$);小青龙汤组、桂枝甘草组及半夏麻黄组肺组织TNF- α 的含量显著下调($P<0.01$);小青龙汤组cAMP、PKA和CREB的mRNA的表达显著上调($P<0.01$),桂枝甘草组、姜辛味组及半夏麻黄组显著上调cAMP和PKA的mRNA表达($P<0.01$);小青龙汤组、桂枝甘草组、姜辛味组及半夏麻黄组显著上调cAMP、PKA和CREB的蛋白表达($P<0.01$),芍药甘草组明显上调CREB蛋白的表达($P<0.05$);小青龙汤可以上调AQP5和 α -ENaC的阳性表达,桂枝甘草组可以上调 α -ENaC的阳性表达;小青龙汤及其方元各组可以减少模型大鼠肺组织水肿,炎性细胞浸润明显减少,支气管黏膜黏连程度减轻。结论:小青龙汤及其方元可以通过提高肺水转运相关蛋白AQP1、AQP5和 α -ENaC的表达,减轻寒饮蕴肺证大鼠病理模型中肺水肿,抑制肺部炎症状态,改善大鼠肺功能,从而恢复肺脏的生理功能,cAMP/PKA信号通路可能参与了该过程,Na⁺-K⁺-ATPase在肺水转运调节中可能发挥了辅助作用,从肺水转运相关蛋白角度初步阐释“肺主行水”的内涵具有一定的客观依据。

[关键词] 小青龙汤; 肺主行水; 水通道蛋白; 上皮钠通道; 钠泵

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R318.13 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)08-0001-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220736

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220209.1508.006.html>

[网络出版日期] 2022-02-09 16:04

Mechanism of Xiao Qinglongtang Regulating Lung Water Transport-related Proteins Based on Theory of Lung Controlling Water Movement

ZHANG Di¹, ZHANG Dong-mei², LU Rui-min¹, JI Jing¹, XU Zong-ying¹, WANG Xu¹, CHEN Meng^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[收稿日期] 2021-09-30

[基金项目] 2020年度北京中医药大学基本科研业务费重点攻关项目(2020-JYB-ZDGG-001);2021年北京中医药大学校级科研纵向发展基金(2021-zxfzjj-012)

[第一作者] 张迪,在读博士,从事仲景学说的多维实证探析研究,E-mail:20180931015@bucm.edu.cn

[通信作者] * 陈萌,博士,教授,博士生导师,从事仲景学说的多维实证探析研究,E-mail:chinmed@yeah.net

[Abstract] **Objective:** To observe the regulatory effect of Xiao Qinglongtang and its ingredients on lung water transport-related proteins, and to explain the biological connotation of lung governing water movement, based on which the regulatory mechanism of Xiao Qinglongtang will be explored. **Method:** According to the composition rules of classical formula, Xiao Qinglongtang (11.22 g·kg⁻¹), Guizhi Gancao (2.70 g·kg⁻¹), Shaoyao Gancao (2.70 g·kg⁻¹), Jiangxinwei (3.90 g·kg⁻¹) and Banxia Muahuang (0.032 7 g·kg⁻¹) were prepared. The pathological model of syndrome of cold fluid accumulated in lung of rats was established by the "coldness of body + drinking cold + cold bath" method, and Xiao Qinglongtang and its ingredients were administrated to intervene with the model rats. Lung function parameters of forced vital capacity (FVC), functional residual capacity (FRC), mean mid-expiratory flow (MMEF), inspiratory time (tI), and expiratory time (tE) were determined by lung function analyzer. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the changes in pathological morphology. The expression of aquaporin (AQP) 1, AQP5, epithelial sodium channel α subunit (α -ENaC) and Na⁺-K⁺-ATPase in lung tissues of rats, the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α), the mRNA expression of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), protein kinase A (PKA) and cAMP-response element binding protein (CREB), and the protein expression of cAMP, PKA, CREB, and phosphorylated-CREB (p-CREB) were detected by immunohistochemistry (IHC), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and Western blot, respectively. **Result:** Compared with normal group, functions of FVC, FRC and MMEF in model group were significantly decreased ($P<0.01$), and the time of tI and tE was significantly prolonged ($P<0.05$, $P<0.01$). The content of TNF- α in lung tissue was significantly increased ($P<0.01$). The mRNA and protein expressions of cAMP, PKA and CREB in lung tissue were significantly decreased ($P<0.01$). The expression of AQP5 and α -ENaC in lung tissue decreased significantly. The alveolar cavity of rats was filled with edema fluid, surrounding tissue hyperemia, inflammatory cell infiltration, bronchial mucosa epithelial adhesion. Compared with model group, Xiao Qinglongtang and its fangyuan group could significantly enhance the FVC, FRC and MMEF functions of model rats ($P<0.05$, $P<0.01$), and tI and tE time were shortened ($P<0.05$, $P<0.01$). The content of TNF- α in lung tissues of Xiao Qinglongtang group, Guizhi Gancao group and Banxia Mahuang group was significantly decreased ($P<0.01$). The mRNA expressions of cAMP, PKA and CREB in Xiao Qinglongtang group were significantly up-regulated ($P<0.01$), and the mRNA expressions of cAMP and PKA in Guizhi Gancao, Jiangxinwei and Banxia Mahuang groups were significantly up-regulated ($P<0.01$). The protein expressions of cAMP, PKA and CREB in Xiao Qinglongtang group, Guizhi Gancao group, Jiangxinwei group and Banxia Mahuang group were significantly up-regulated ($P<0.01$), and the protein expression of CREB in Shaoyao Gancao group was significantly up-regulated ($P<0.05$). Xiao Qinglongtang could up-regulate the positive expression of AQP5 and α -ENaC, and Guizhi Gancao group could up-regulate the positive expression of α -ENaC. Xiao Qinglongtang and its fangyuan can reduce the lung edema, inflammatory cell infiltration and bronchial mucosal adhesion of model rats. **Conclusion:** Xiao Qinglongtang and its ingredients can reduce lung edema and inhibit inflammation by improving the expression of lung water transport-related proteins AQP1, AQP5, and α -ENaC through cAMP/PKA pathway, thereby restoring the lung functions in rats with syndrome of cold fluid accumulated in lung. Na⁺-K⁺-ATPase may play an auxiliary role in the regulation of lung water transport. This provides a certain objective basis for preliminarily elucidating the connotation of lung governing water movement from the perspective of lung water transport-related proteins.

[Keywords] Xiao Qinglongtang; lung governing water movement; aquaporins; epithelial sodium channel; Na⁺-K⁺-ATPase

中医学认为,“肺主通调水道”“肺主行水”,对于某些水液代谢失常的疾病,常从肺论治。如中医

学常用“提壶揭盖法”论治小便不利、全身水肿等证。“肺主行水”主要依赖于肺主气的功能,肺主宣

发,则有助于脾气散精;肺主肃降,则有助于通调水道,下输膀胱。若宣发肃降失常,不仅会出现或咳、或喘,也会发生水液代谢异常,表现为或利、或噎、或小便不利等症。因此中医学认为,肺在人体水液代谢中占有重要地位。现代医学认为,肺水转运主要存在两种机制,一种为被动转运,一种为主动转运。前者所借助的 Starling 力(毛细血管静力压与血浆胶体渗透压)被认为是维持肺泡腔内无液体的主要因素,这是一种依靠肺组织内各方面压力与张力作用的不消耗能量的水转运过程^[1-2]。肺水主动转运的过程中需要借助一些相关蛋白的参与,根据目前研究已知主要为上皮钠通道(ENaC)、钠钾泵($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$)及水通道蛋白(AQPs)等^[3-4]。从肺水转运相关蛋白角度进行解读,有助于辅助阐释“肺主行水”的内涵。

寒饮蕴肺证是由于素体肺阳虚衰,导致肺主行水的功能减弱,水液不能正常输布运行,而聚水成饮,伏于肺中所致的一种与呼吸功能相关的证候^[5]。小青龙汤作为著名的散寒蠲饮经方。根据方元的组方规律^[6-7],可以将其拆分为4组方元:温阳化饮的桂枝甘草汤,滋阴利水的芍药甘草汤,肺脾双调、止咳止利的姜辛味组合,以及既可用于饮蓄中焦的心下悸,也是平喘首选方元的半夏麻黄丸,四者涉及与水液代谢相关的阴阳、脏腑、表里等理论,生动体现了张仲景的治饮大法。因此本研究通过建立寒饮蕴肺证大鼠模型,从方元角度来探索小青龙汤调节肺水转运的作用机制,从现代分子生物学角度解读张仲景的治饮思路,同时进一步辅助阐释“肺主行水”的内涵。

1 材料

1.1 动物 56只SPF级Wistar雄性大鼠,体质量160~180g,购于北京斯贝福生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0010。动物饲养于北京中医药大学SPF级动物房,室温24~26℃,湿度40%~60%。本研究由北京中医药大学实验动物伦理委员会审批通过,批号BUCM-4-2019092901-3080。

1.2 试剂 BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号PC0020);大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海科艾博生物公司,批号CK-E30635R);AQP5抗体、环磷酸腺苷(cAMP)反应元件结合蛋白(CREB)抗体(南京Bioworld公司,批号分别为BS-3477、BS-6230);AQP1抗体、上皮细胞钠通道 α 亚单位(α -ENaC)抗体、ATP1A1抗体、cAMP、蛋白激酶A

(PKA)抗体、磷酸化(p)-CREB抗体(北京BIOSS生物技术有限公司,批号分别为bs-1506R、bs-2957R、bs-7232R、bs-12707R、bs-12707R、bs-0036R);生物素化羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab6721、ab181602);总RNA提取试剂盒、cDNA合成试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(北京基谱生物科技有限公司,批号分别为GPQ1801、GPQ1803、GPQ1808);苏木素染色液、伊红染色液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1004、G1001)。

1.3 仪器 NHRHG6005型四季气候模拟系统(重庆虹瑞试验仪器有限公司);Forced Maneuvers型动物肺功能检测系统(英国EMMS公司);Nikon Ci-S型倒置显微镜、DS-U3型成像系统(日本Nikon公司);186-1096型酶标仪(美国Bio-Rad公司);PP-1150型电泳仪(北京凯元信瑞仪器有限公司);Line Gene 9600 Plus型Real-time PCR仪(杭州博日科技股份有限公司)。

1.4 中药溶液配制 小青龙汤组方:桂枝、麻黄、干姜、赤芍、甘草、细辛各15g、清半夏21.33g、五味子13.33g^[8],均为免煎颗粒,购于北京华夏蓝筹生物科技有限公司,批号分别为1907002W、1908002S、1908001W、1808001C、1908007C、1908001W、1905001C、1909001W。参照《药理实验方法学》中人与大鼠等效剂量分别换算求得大鼠所用桂枝、麻黄、干姜、赤芍、甘草、细辛、清半夏和五味子分别为1.35、1.35、1.35、1.35、1.35、1.35、1.92、1.20 g·kg⁻¹。分别配置成大鼠所用药物液:小青龙汤组、桂枝甘草组(桂枝1.35 g·kg⁻¹,甘草1.35 g·kg⁻¹)、芍药甘草组(赤芍1.35 g·kg⁻¹,甘草1.35 g·kg⁻¹)、姜辛味组(干姜1.35 g·kg⁻¹,细辛1.35 g·kg⁻¹,五味子1.20 g·kg⁻¹)和半夏麻黄组(清半夏1.92 g·kg⁻¹,麻黄1.35 g·kg⁻¹),含生药量分别为11.22、2.70、2.70、3.90、3.27 g·kg⁻¹,以蒸馏水混匀相应药物,煮沸,磁力搅拌器不断搅拌至完全溶解,浓缩为含生药质量浓度为11.22、2.70、2.70、3.90、3.27 g·mL⁻¹的溶液,4℃保存备用。

2 方法

2.1 模型建立及药物干预 将56只大鼠随机抽取8只作为正常组,其余大鼠采用四季气候模拟系统,每日9:00~11:00,14:00~16:00,设置温度为4℃对大鼠施加“形寒”刺激;再对大鼠进行灌胃0℃冰水施加“冷饮”因素;随后令大鼠在(12±2)℃水中游泳30 min增加“劳则气耗”损伤因素^[9],连续干预5周。

造模后大鼠出现体质量减轻、体温降低、被毛脱落、便溏、口鼻分泌物增加、呼吸节律紊乱等症状,表明造模成功^[10],将造模大鼠随机分为模型组、小青龙汤组、桂枝甘草组、芍药甘草组、姜辛味组和半夏麻黄组,每组8只。各药物干预组从造模结束后24 h开始,每日1次给予相应药液灌胃($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$);正常组、模型组给予等体积蒸馏水,连续干预2周。

2.2 Forced Maneuvers系统检测大鼠肺功能 将系统参数设定为呼吸频率为75次/min,呼吸比设定为15:10。各组大鼠腹腔注射7%水合氯醛麻醉($5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)后,背位固定于鼠板,颈部皮肤消毒后纵行切开2~3 cm,暴露气管,于3、4气管环中间施行“倒T”切口,施行气管插管。将大鼠置入体描器,气管插管与体描器内接口相连,体描器连接生物信号采集系统传感器。校准调试结束后立即点击计算机软件功能区的“Read Volume”按钮,开始测定功能残气量(FRC)、用力肺活量(FVC)、平均呼气中期流量(MMEF)、吸气时间(tI)、呼气时间(tE)等指标。

2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肺组织病理形态学改变 肺功能测定结束后,迅速摘取大鼠的右肺组织。固定、脱水、透明、包埋、切片、HE染色、封片。每组选取3张切片,每张切片选取5个高倍视野($\times 400$)于光镜下进行观察、拍照、分析。

2.4 ELISA检测大鼠肺组织TNF- α 含量 各组取右肺组织100 mg,与磷酸盐缓冲液(PBS)0.9 mL充分匀浆后取上清;BCA法测定肺组织总蛋白浓度;按照ELISA试剂盒说明书,测定肺组织TNF- α 含量。绘制标准品线性回归曲线,计算各样品浓度。

2.5 免疫组化法检测大鼠肺组织AQP5、AQP1、 α -ENaC和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 蛋白的表达 肺组织常规固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片等处理;柠檬酸钠/EDTA进行抗原修复;3% H_2O_2 阻断过氧化酶;封闭;孵育一抗(AQP5、ATP1A1, 1:100; AQP1、 α -ENaC, 1:500),另设一组以PBS代替一抗做空白对照;二抗孵育(1:500);加链霉亲和素、DAB显色、复染、脱水、封片。光镜下观察各组大鼠肺组织中AQP5、AQP1、 α -ENaC、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的表达情况,每组选择3张切片,每张切片随机选取5个高倍视野($\times 400$)进行拍照、记录。应用Image Pro Plus 6.0图文分析软件对图像进行分析,统计每个视野下棕黄色颗粒的积分吸光度 IA , IA /有效目标分布区域的面积(Area)得到平均积分吸光度 AA ,取平均值^[11]。

2.6 Real-time PCR检测肺组织cAMP、PKA和CREB mRNA表达 各组称取大鼠右肺组织

100 mg,按试剂盒说明书提取总RNA,进行RNA纯度鉴定;反转录后,以cDNA为模板进行PCR反应,配制反应体系,设置扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性15 s,40个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s;以GAPDH作为内参照,每个样品设置3个复孔,取均值;通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行均一化处理后,再进行统计分析。引物设计由北京基谱生物科技有限公司完成,cAMP引物:上游5'-CCGTGCTGTGGATGACTTCA-3',下游5'-TAAGTCTGTGATGCC TTGCTA-3',长度160 bp;PKA引物:上游5'-CTTGTTTCGGCTGGAGTATTCTT-3',下游5'-AATCTGTGACCTGGATGTAACC-3',长度247 bp;CREB引物:上游5'-AGTTGTTATGGCGTCTC-3',下游5'-GCTTCCCTGTTCTTCATT3',长度93 bp;GAPDH引物:上游5'-TGGAGTCTACTGGCGTCTT-3',下游5'-TGTCATATTTCTCGTGGTTC A-3',长度138 bp。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织cAMP、PKA、CREB和p-CREB蛋白表达 各组称取大鼠右肺组织100 mg,按1:9比例进行裂解,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min(离心半径10 cm),取上清;BCA法测定蛋白浓度;蛋白样品置于沸水中煮10 min使其变性;配制SDS-PAGE凝胶,每孔总量60 μg 进行湿转膜,封闭,一抗cAMP、PKA、CREB和p-CREB(1:500),内参GAPDH(1:5 000);4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜;二抗(1:5 000)室温孵育2 h,洗膜;ECL显色,化学发光成像系统成像、拍照。采用Quantity One v.4.6.2软件读取条带灰度值,以目的蛋白与内参灰度比值表示蛋白的相对表达量。

2.8 统计学处理 采用SPSS 25.0软件进行统计学分析。服从正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。若方差齐,两两比较用最小显著性差异法(LSD)- t 法;若方差不齐,两两比较用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠肺功能的影响 与正常组比较,模型组FVC、FRC与MMEF功能显著下降($P < 0.01$),tI与tE明显延长($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,各给药组可明显提高FVC、FRC与MMEF功能($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表1。

3.2 对大鼠肺组织病理形态学的影响 光镜下显示,正常组大鼠肺组织肺泡腔呈空泡状薄壁结构,结构清晰、完整,微量炎性细胞浸润。支气管为单层纤毛柱状上皮结构,支气管黏膜上皮细胞排列整

表1 小青龙汤及其方元对大鼠肺功能的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

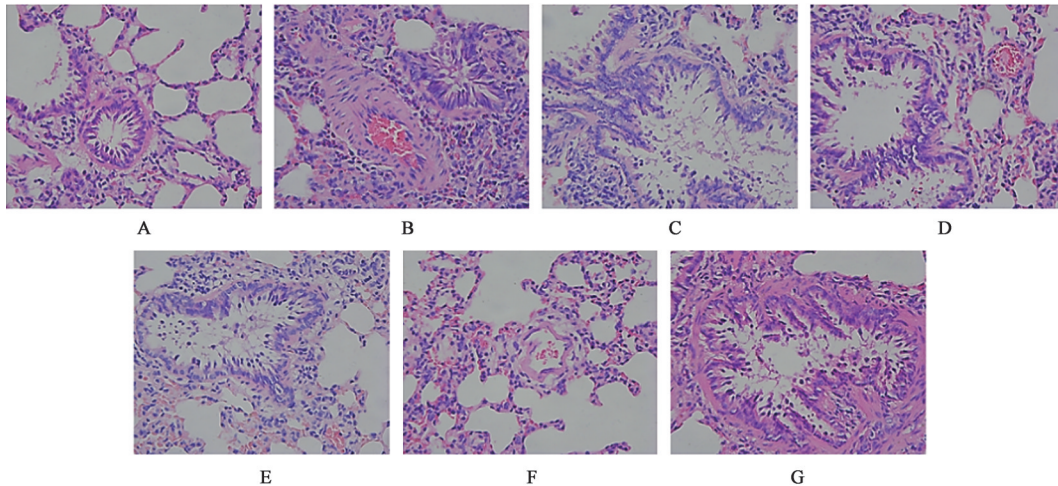
Table 1 Effect of Xiao Qinglongtang and its Fangyuan on pulmonary function in rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FVC/mL	FRC/mL	MMEF/mL·s ⁻¹	tI/s	tE/s
正常组		15.80±0.56	3.89±0.35	90.38±1.13	0.25±0.01	0.24±0.01
模型组		11.45±0.34 ²⁾	2.18±0.32 ²⁾	53.00±9.48 ²⁾	0.34±0.03 ¹⁾	0.39±0.03 ²⁾
小青龙汤组	11.22	16.13±0.55 ⁴⁾	4.31±0.65 ⁴⁾	85.86±3.05 ³⁾	0.25±0.01 ³⁾	0.24±0.01 ⁴⁾
桂枝甘草组	2.70	17.38±0.90 ⁴⁾	3.54±0.67 ⁴⁾	91.24±6.15 ⁴⁾	0.22±0.01 ⁴⁾	0.25±0.03 ⁴⁾
芍药甘草组	2.70	16.47±0.73 ⁴⁾	3.66±0.55 ⁴⁾	85.74±3.73 ³⁾	0.26±0.01	0.28±0.02 ³⁾
姜辛味组	3.90	16.90±0.35 ⁴⁾	4.11±0.28 ⁴⁾	88.74±3.76 ⁴⁾	0.24±0.01 ⁴⁾	0.21±0.01 ⁴⁾
半夏麻黄组	3.27	14.45±0.33 ⁴⁾	3.49±0.25 ⁴⁾	93.40±1.84 ⁴⁾	0.22±0.01 ⁴⁾	0.30±0.01

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表2-表5同)

齐,内无渗出物,纤毛无异常脱落;模型组大鼠肺组织肺泡腔内充满淡红色较均匀的水肿液。部分肺泡断裂、融合成大气腔,部分间隔增宽,间隔中可见大量炎性细胞浸润。支气管黏膜上皮坏死、黏连,伴有上皮细胞脱落。肺动脉壁明显增厚,血管平

滑肌增生;各药物干预组与模型组比较,大鼠肺组织肺泡扩张、断裂情况有所改善,肺泡腔水肿液减少,黏膜黏连程度减轻,毛细血管扩张充血程度减轻,肺泡腔、支气管及炎性细胞浸润明显减少。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.小青龙汤组;D.桂枝甘草组;E.芍药甘草组;F.姜辛味组;G.半夏麻黄组(图4同)

图1 小青龙汤及其方元对大鼠肺组织病理学的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of Xiao Qinglongtang and its Fangyuan on lung pathological change in rats (HE,×400)

3.3 对大鼠肺组织TNF-α含量表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肺组织中TNF-α含量表达显著升高(P<0.01);与模型组比较,小青龙汤、桂枝甘草组及半夏麻黄组的干预可以显著下调TNF-α的含量(P<0.01)。见表2。

3.4 对大鼠肺组织中肺水转运相关蛋白表达的影响 免疫组化染色结果显示,阴性细胞呈蓝色,底物为白色;阳性细胞呈棕黄色,在胞浆及胞膜均有一定表达,以胞浆为主。AQP1与AQP5阳性颗粒分别分布于肺微血管内皮细胞与I型肺泡上皮细胞中,α-ENaC与Na⁺-K⁺-ATPase在II型肺泡上皮细胞

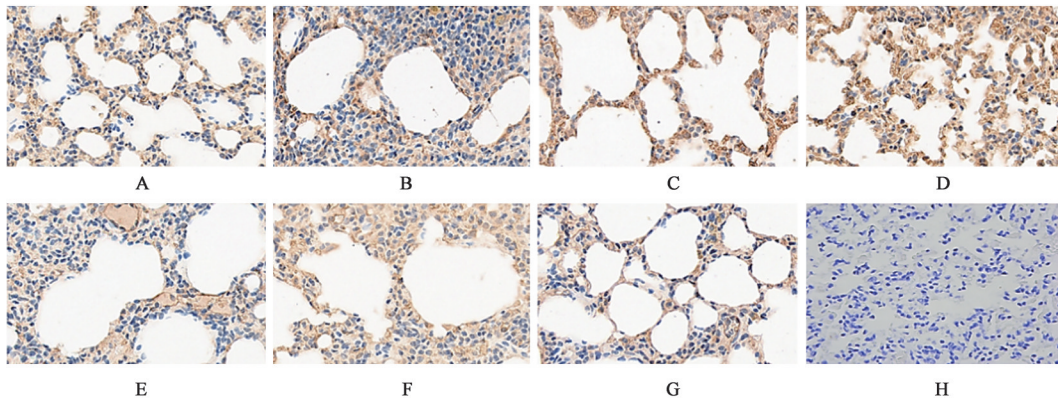
表2 小青龙汤及其方元对大鼠肺组织TNF-α含量表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Xiao Qinglongtang and its Fangyuan on TNF-α expression in lung tissue of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF-α/ng·g ⁻¹
正常组		7.25±0.34
模型组		13.17±1.37 ²⁾
小青龙汤组	11.22	6.05±0.75 ⁴⁾
桂枝甘草组	2.70	9.94±0.81 ⁴⁾
芍药甘草组	2.70	11.81±0.66
姜辛味组	3.90	10.07±1.19
半夏麻黄组	3.27	9.54±0.70 ⁴⁾

中广泛表达。与正常组比较,模型组大鼠肺组织 AQP5 和 α -ENaC 蛋白表达明显减低,与模型组比较,小青龙汤的干预能够显著提高 AQP5 和 α -ENaC 的阳性表达,桂枝甘草组能够提高 α -ENaC 的阳性

表达。与正常组比较,模型组大鼠肺组织 AQP1 表达减低,各药物组干预后可以上调其表达;与正常组比较,模型组大鼠肺组织 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的表达增多,小青龙汤亦能提高其阳性表达。见图2-图5。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 小青龙汤组;D. 桂枝甘草组;E. 芍药甘草组;F. 姜辛味组;G. 半夏麻黄组;H. PBS正常组(图3-图5同)

图2 小青龙汤及其方元对大鼠肺组织中 AQP1 表达的影响(免疫组化, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Xiao Qinglongtang and its Fangyuan on AQP1 expression in lung tissue of rats (IHC, $\times 400$)

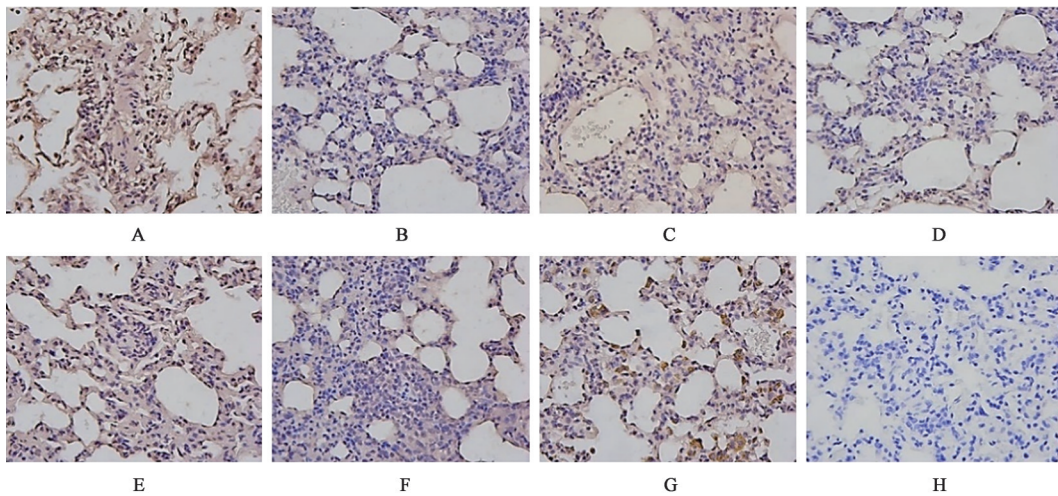


图3 小青龙汤及其方元对大鼠肺组织中 AQP5 表达的影响(免疫组化, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of Xiao Qinglongtang and its Fangyuan on AQP5 expression in lung tissue of rats (IHC, $\times 400$)

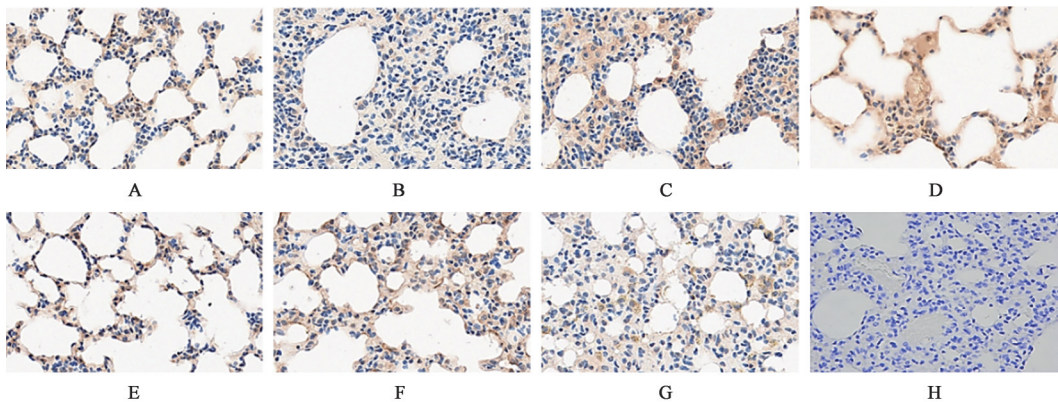


图4 小青龙汤及其方元对大鼠肺组织中 α -ENaC 表达的影响(免疫组化, $\times 400$)

Fig. 4 Effect of Xiao Qinglongtang and its Fangyuan on α -ENaC expression in lung tissue of rats (IHC, $\times 400$)

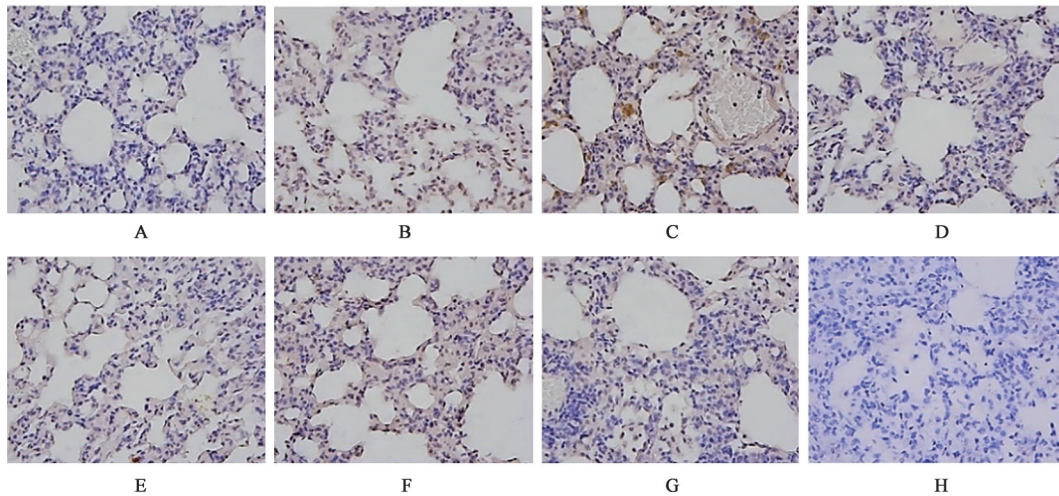


图5 小青龙汤及其方元对大鼠肺组织中Na⁺-K⁺-ATPase表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 5 Effect of Xiao Qinglongtang and its Fangyuan on Na⁺-K⁺-ATPase expression in lung tissue of rats (IHC, ×400)

3.5 对大鼠肺组织cAMP, PKA, CREB mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肺组织中cAMP, PKA及CREB的mRNA表达显著减低($P < 0.01$);与模型组比较,小青龙汤、桂枝甘草组、姜辛味组及半夏麻黄组的干预可以显著上调cAMP与PKA的mRNA表达($P < 0.01$),小青龙汤可以显著上

调CREB的mRNA表达($P < 0.01$);桂枝甘草组、姜辛味组及半夏麻黄组CREB的mRNA表达有上升趋势,芍药甘草组PKA的mRNA表达有上升趋势,但差异无统计学意义。皮尔森相关系数(Pearson correlation coefficient)分析,该条通路的各分子间表达具有显著相关性($P < 0.01$)。见表3。

表3 小青龙汤及其方元对大鼠肺组织cAMP、PKA、CREB mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Xiao Qinglongtang and its Fangyuan on cAMP, PKA, and CREB mRNA expression in lung tissue of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	cAMP	PKA	CREB
正常组		0.99±0.08	0.93±0.10	1.04±0.06
模型组		0.28±0.02 ²⁾	0.18±0.08 ²⁾	0.33±0.09 ²⁾
小青龙汤组	11.22	0.91±0.03 ⁴⁾	1.00±0.06 ⁴⁾	1.08±0.08 ⁴⁾
桂枝甘草组	2.70	0.43±0.02 ⁴⁾	0.46±0.04 ⁴⁾	0.70±0.02
芍药甘草组	2.70	0.28±0.01	0.22±0.05	0.33±0.01
姜辛味组	3.90	0.47±0.02 ⁴⁾	0.60±0.06 ⁴⁾	0.67±0.02
半夏麻黄组	3.27	0.45±0.04 ⁴⁾	0.47±0.03 ⁴⁾	0.67±0.10

3.6 对大鼠肺组织cAMP、PKA、p-CREB, CREB蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肺组织中cAMP、PKA及CREB的蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,小青龙汤、桂枝甘草组、姜辛味组及半夏麻黄组的干预可以显著上调cAMP、PKA及CREB的蛋白表达($P < 0.01$),芍药甘草组可以明显上调CREB的蛋白表达($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组大鼠肺组织中p-CREB的表达下调,各药物组干预后可以上调其表达,但组间差异无统计学意义。见表4、图6。

4 讨论

小青龙汤作为寒饮蕴肺证治疗的经典方剂,其

组方井然有序:“辛甘化阳”以温阳化饮的桂枝甘草组合,“酸甘化阴”以滋阴利水的芍药甘草组合,调肺以助通调水道、运脾以助运化水液的姜辛味组合和发越表里、长于去表里之水的半夏麻黄组合,全方主治明确,其作用机制有待进一步深入研究。

AQPs作为一种普遍存在的膜结合通道,表达于多种参与液体运输的上皮细胞和内皮细胞中,不仅可以高度选择水的通过,还可以促进其他小溶质的跨膜转运,包括气体(CO₂和NH₃)^[12-14],过氧化氢^[15],以及砷、硼和硅等金属^[16]。到目前为止,13种AQPs广泛分布于各种器官和组织中的特定细胞类型中,已在人类中得到表征,并根据AQPs的主要序

表4 小青龙汤及其方元对大鼠肺组织cAMP、PKA、p-CREB、CREB蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Xiao Qinglongtang and its Fangyuan on cAMP, PKA, p-CREB, and CREB mRNA expression in lung tissue of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	cAMP/GAPDH	PKA/GAPDH	p-CREB/GAPDH	CREB/GAPDH
正常组		0.54±0.04	0.60±0.12	0.50±0.08	0.62±0.06
模型组		0.17±0.06 ²⁾	0.13±0.05 ²⁾	0.11±0.03	0.17±0.12 ²⁾
小青龙汤组	11.22	0.50±0.03 ⁴⁾	0.59±0.10 ⁴⁾	0.51±0.05	0.64±0.04 ⁴⁾
桂枝甘草组	2.70	0.35±0.03 ⁴⁾	0.42±0.12 ⁴⁾	0.31±0.06	0.46±0.07 ⁴⁾
芍药甘草组	2.70	0.19±0.04	0.30±0.07	0.22±0.03	0.29±0.06 ³⁾
姜辛味组	3.90	0.31±0.06 ⁴⁾	0.43±0.11 ⁴⁾	0.32±0.02	0.44±0.02 ⁴⁾
半夏麻黄组	3.27	0.32±0.06 ⁴⁾	0.42±0.13 ⁴⁾	0.31±0.01	0.43±0.03 ⁴⁾

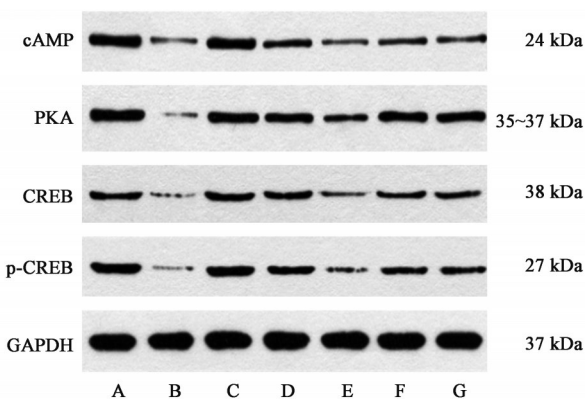


图6 大鼠肺组织cAMP、PKA、p-CREB及CREB蛋白表达电泳
Fig. 6 Electrophoresis of cAMP, PKA, CREB, and p-CREB protein expression in lung tissue of rats

列可被分为3个亚组:水选择性通道蛋白(AQP0、1、2、4、5、6、8),水甘油通道蛋白(AQP3、7、9、10)和超水通道蛋白(AQP11、12)^[17]。在人体内,每个器官系统至少存在一种AQPs并参与维持细胞内外液体稳态^[18]。中医学认为人体内水液代谢是由多脏腑多环节共同配合完成的,正如《黄帝内经》言:“饮入于胃,游溢精气,上输于脾。脾气散精,上归于肺,通调水道,下输膀胱。水精四布,五经并行……”,与现代医学中AQPs参与多器官水液代谢调节的认识具有相似之处。因此,对AQPs生物学的进一步了解,不仅有助于为探究临床水液代谢障碍疾病的防治提供新思路,也对于开发新的治疗靶点或可靠的诊断及预后生物标志物具有重要意义。“肺为水之上源”,目前已知肺组织中主要表达AQP1、AQP3、AQP4、AQP5、AQP8及AQP9等几种水通道蛋白,肺泡上皮主要由I型细胞组成,其顶膜表达AQP5,微血管内皮细胞表达AQP1^[19],二者发挥着主要的肺水转运作用,帮助清除肺泡内多余液体,实现水分子的跨膜转运^[20-21]。根据基因敲除小鼠肺部AQPs的实验结果显示,水分子主要通过AQPs依

赖的跨细胞方式穿过肺微血管内皮和上皮,而不是通过紧密连接的细胞内途径扩散,敲除AQP1及AQP5后,可导致经上皮的水渗透性降低,且肺通透性指数与二者的基因表达负相关^[22-25]。体内外研究表明,在肺损伤包括缺氧条件下所致的肺水代谢障碍中,以AQPs中的AQP1和AQP5表达改变更为显著^[26-28],其表达减低时,肺水转运能力下降,积聚于肺泡腔内,渗出液吸收障碍,致肺泡内水转出异常。上调AQP1和AQP5的表达,促进水泡内水的吸收,减轻肺水肿,提高肺功能^[29-30]。促炎因子TNF- α 的过度分泌也会加剧肺水肿状态,且与AQP1和AQP5表达负相关,抑制其过表达,可以改善肺水肿状态,减轻炎性细胞浸润,进而增强呼吸功能^[31-33]。

肺泡上皮细胞内的钠水转运是肺泡内液体清除的关键环节,该过程中需要借助ENaC和Na⁺-K⁺-ATPase等蛋白分子的参与,协调肺水主动转运。人体细胞内外液体的渗透平衡是维持细胞正常生理功能的基础,其中Na⁺是维持细胞外液渗透压的主要决定因素^[34]。肺ENaC是肺泡内Na⁺转运过程的重要组成部分,为肺泡间隙液体的清除提供了动力。肺ENaC是一种异源三聚体蛋白通道,表达于气道上皮细胞的顶端表面^[35]。ENaC通常由3个同源亚基(α 、 β 和 γ 亚基)组成,其中 α 亚基不仅在肺泡上皮细胞中含量最高,也是维持水-钠转运及肺水清除的关键亚基^[36]。研究发现, α -ENaC表达减低会抑制肺泡液体主动清除功能,引起气道表面液体稳态失衡,导致肺损伤,引发相关呼吸系统疾病,提高 α -ENaC的表达不仅能够加速肺泡液体清除率,并能够改善呼吸系统疾病的肺功能表现,二者具有显著相关性^[37-39]。Na⁺-K⁺-ATPase是P型ATPase超家族的成员,位于肺泡上皮细胞的基底外侧表面^[40-42],生理情况下,ENaC协同Na⁺-K⁺-ATPase,主动将Na⁺

排出细胞,发挥肺泡液体清除功能,提高肺泡上皮抵抗肺损伤的能力^[43-44]。研究发现,在肺损伤模型中观察到了 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的表达下调,其所致的肺泡液清除障碍可以通过增加 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 表达逆转,并增强肺泡上皮细胞通透性,促进液体吸收^[45-47]。许多肺系疾病中均存在着肺泡缺氧(通气与换气功能障碍),缺氧条件下,肺 ENaC 及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的表达亦减低、活性减弱^[48]。

本研究发现,寒饮蕴肺证模型大鼠肺组织中 AQP1 、 AQP5 与 $\alpha\text{-ENaC}$ 表达减低,在小青龙汤及各组方元药物的干预作用下,能够不同程度地上调其蛋白的数值表达;寒饮阻于肺内,因而导致肺功能下降,经过药物的干预,肺通气与换气障碍也得到了不同程度地缓解,说明小青龙汤及其方元均发挥了一定的肺水调节作用,其生物学机制之一可能是通过调节肺水转运蛋白来实现的。光镜下观察模型组大鼠肺组织的病理表现,发现有肺水肿状态伴随炎性细胞浸润;测定肺组织内 $\text{TNF-}\alpha$ 的含量,模型组大鼠 $\text{TNF-}\alpha$ 的含量呈现升高趋势,经过各组药物的干预, $\text{TNF-}\alpha$ 含量减低,镜下肺内组织水肿减轻且炎症症状得到改善,说明肺内水肿液的清除有助于肺脏恢复正常的生理功能,同时减轻炎症刺激,有利于水肿液的吸收,改善肺功能,二者具有一定的相关性。在本研究中观察到, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 在模型组大鼠的肺组织中表达上调,与既往文献的报道结果不一致,合理推测在造模过程中,大鼠肺组织为了加速肺内异常液体的清除与吸收,出现了过度防御而发生的代偿性负性调节,结合病理观察结果,这种代偿性调节并没有帮助肺内水肿液的清除与吸收,肺水肿及炎症表现仍然存在,应该进行相应的动态观察,这也是本研究的不足之一。不过,经过小青龙汤的干预, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的表达增加,结合该组大鼠的其他指标表现,认为 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 可能发挥了辅助作用,但这种修复机制是多种生物学机制共同参与的结果,协同调节肺脏的水液代谢,从而改善肺组织的生理功能。

cAMP 作为机体内重要的第二信使之一,其发挥功能主要是通过激活 PKA 系统来实现,被激活的 PKA 在细胞核内主要的靶蛋白为 CREB , CREB 被磷酸化后,进一步发挥生物学功能^[49]。研究表明, cAMP/PKA/CREB 通路参与了 AQPs 的表达、运输、门控及分布等生物学过程^[50],其中,在肺上皮细胞 AQP5 的表达上, cAMP 从基因转录到蛋白翻译环节均有参与,人与大鼠的 AQP5 只有一个 PKA 序列^[51]

且 PKA 是调节 AQP5 基因转录环节不可或缺的元件,同时 cAMP 还能够对细胞膜上 AQP5 的分子转移数目进行调控^[52],在 AQP5 的开放阅读框(ORF)的上游还表达有 CREB 的转录起始位点^[53],说明 AQP5 蛋白存在 cAMP/PKA/CREB 通路的调控机制。对寒饮伏肺证型模型大鼠进行药物干预前后比较, cAMP 、 PKA 、 CREB 及 AQP5 基因和蛋白的表达上调有助于恢复气道内液体平衡,改善呼吸功能^[54]。体外研究发现, cAMP 还可以增加 $\alpha\text{-ENaC}$ 的表达,加入 PKA 抑制剂后, $\alpha\text{-ENaC}$ 的表达明显下降,应用药物减弱 cAMP 诱导的 CREB 磷酸化后, $\alpha\text{-ENaC}$ 水平也呈下降趋势^[55],表明 cAMP/PKA/CREB 通路可能也参与了 $\alpha\text{-ENaC}$ 表达的调节。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 作为肺泡上皮细胞 Na^+ 转运系统的另一关键元件, cAMP 可以增强其酶活性,调节肺内液体平衡,发挥肺水转运功能^[56]。

在本研究中,寒饮蕴肺证模型大鼠肺功能表现下降、肺组织水肿伴有炎症表现,相关肺水转运蛋白如 AQP1 、 AQP5 、 $\alpha\text{-ENaC}$ 等表达下调,肺组织 cAMP/PKA/CREB 通路分子表达被抑制,经过小青龙汤及其方元的干预治疗,不同程度地上调了模型大鼠肺组织中 cAMP 、 PKA 、 CREB 、 p-CREB mRNA及蛋白表达,上调肺水转运蛋白的含量,说明小青龙汤及其方元可能通过 cAMP/PKA/CREB 通路调节寒饮蕴肺证大鼠肺组织中肺水转运相关蛋白的表达,从而改善肺组织的水肿状态,减轻炎症反应,纠正肺水转运失衡,保护大鼠肺脏,恢复其生理功能。综上,通过调节肺水转运蛋白,小青龙汤及各方元组均发挥了一定的肺水调节作用,初步阐释了“肺主行水”内涵,为下一步探索其生物学机制奠定了基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] STAUB N C. Pulmonary edema [J]. *Physiol Rev*, 1974,54(3):678-811.
- [2] 居越昆. Starling力与压力性肺水肿[J]. *生理科学*, 1988(1):36-38,35.
- [3] KRAINER G, SCHENKEL M, HARTMANN A, et al. CFTR transmembrane segments are impaired in their conformational adaptability by a pathogenic loop mutation and dynamically stabilized by Lumacaftor [J]. *J Biol Chem*, 2020,295(7):1985-1991.
- [4] MATTHAY M A, FOLKESSON H G, CLERICI C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of

- pulmonary edema [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82 (3) : 569-600.
- [5] 张伯奥. 中医内科学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:87.
- [6] 陈萌,王庆国. 浅谈经方方的研究思路[J]. 中国中医药信息杂志,2003,10(6):5-7.
- [7] 张迪,王文雅,许宗颖,等. 从经方方元解读小青龙汤的组方内涵[J]. 吉林中医药,2021,41(8):1094-1097.
- [8] 李宇航.《伤寒论》方药剂量与配伍比例研究[M]. 北京:人民卫生出版社,2015:64-65.
- [9] 陈林知,戴天木. 寒饮蕴肺证大鼠病理模型的建立[J]. 湖北中医杂志,2007,29(12):13-14.
- [10] 张迪. 小青龙汤散寒蠲饮的组方规律研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2021: 48-49.
- [11] 徐洪,杨方,袁媛,等. 免疫组织化学 Image Pro Plus 图像半定量分析的参数选择[J]. 解剖学杂志,2012, 35(1):37-41.
- [12] HERRERA M, GARVIN J L. Aquaporins as gas channels[J]. *Pflugers Arch*,2011,462(4):623-630.
- [13] KALDENHOFF R, KAI L, UEHLEIN N. Aquaporins and membrane diffusion of CO₂ in living organisms[J]. *Biochim Biophys Acta*,2014,1840(5):1592-1595.
- [14] MAUREL C, BOURSIAIC Y, LUU D T, et al. Aquaporins in plants [J]. *Physiol Rev*, 2015, 95 (4) : 1321-1358.
- [15] BIENERT G P, CHAUMONT F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide [J]. *Biochim Biophys Acta*,2014,1840(5):1596-1604.
- [16] GARNEAU A P, CARPENTIER G A, MARCOUX A A, et al. Aquaporins mediate silicon transport in humans[J]. *PLoS One*,2015,10(8):e0136149.
- [17] ISHIBASHI K, HARA S, KONDO S. Aquaporin water channels in mammals[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2009, 13 (2):107-117.
- [18] ABIR-AWAN M, KITCHEN P, SALMAN M M, et al. Inhibitors of mammalian aquaporin water channels [J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(7):1589.
- [19] SONG Y, JAYARAMAN S, YANG B, et al. Role of aquaporin water channels in airway fluid transport, humidification, and surface liquid hydration[J]. *J Gen Physiol*,2001,117(6):573-582.
- [20] WITTEKINDT O H, DIETL P. Aquaporins in the lung [J]. *Pflugers Arch*,2019,471(4):519-532.
- [21] BOROK Z, VERKMAN A S. Lung edema clearance: 20 years of progress: Invited review: Role of aquaporin water channels in fluid transport in lung and airways [J]. *J Appl Physiol* (1985),2002,93(6):2199-2206.
- [22] KING L S, NIELSEN S, AGRE P, et al. Decreased pulmonary vascular permeability in aquaporin-1-null humans[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2002,99(2) : 1059-1063.
- [23] SU X, SONG Y, JIANG J, et al. The role of aquaporin-1 (AQP1) expression in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Respir Physiol Neurobiol*,2004,142(1):1-11.
- [24] MA T, FUKUDA N, SONG Y, et al. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice [J]. *J Clin Invest*,2000,105(1):93-100.
- [25] GAO J, ZHOU L, GE Y, et al. Effects of different resuscitation fluids on pulmonary expression of aquaporin1 and aquaporin-5 in a rat model of uncontrolled hemorrhagic shock and infection [J]. *PLoS One*,2013,8(5):e64390.
- [26] FABREGAT G, GARCÍA-DE-LA-ASUNCIÓN J, SARRIÁ B, et al. Expression of aquaporins 1 and 5 in a model of ventilator-induced lung injury and its relation to tidal volume [J]. *Exp Physiol*, 2016, 101 (11):1418-1431.
- [27] TAN J, GAO C, WANG C, et al. Expression of aquaporin-1 and aquaporin-5 in a rat model of high-altitude pulmonary edema and the effect of hyperbaric oxygen exposure [J]. *Dose Response*, 2020, 18 (4) : 1559325820970821.
- [28] WU Y, PAN C Y, GUO C Z, et al. Expression of aquaporin 1 and 4 in rats with acute hypoxic lung injury and its significance[J]. *Genet Mol Res*,2015,14 (4):12756-12764.
- [29] MA C, DONG L, LI M, et al. Qidonghuoxue decoction ameliorates pulmonary edema in acute lung injury mice through the upregulation of epithelial sodium channel and aquaporin-1 [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*,2020,doi:10.1155/2020/2492304.
- [30] WANG K, FENG Y L, WEN F Q, et al. Decreased expression of human aquaporin-5 correlated with mucus overproduction in airways of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*,2007,28(8):1166-1174.
- [31] IJAZ B, SHABBIR A, SHAHZAD M, et al. Amelioration of airway inflammation and pulmonary edema by *Teucrium stocksianum* via attenuation of pro-inflammatory cytokines and up-regulation of AQP1 and AQP5 [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2021, 284: 103569.
- [32] SHAHID H, SHAHZAD M, SHABBIR A, et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory potential of curcumin for the treatment of allergic asthma: Effects on expression levels of pro-inflammatory cytokines and aquaporins [J]. *Inflammation*, 2019, 42 (6) : 2037-

- 2047.
- [33] RANA S, SHAHZAD M, SHABBIR A. Pistacia integerrima ameliorates airway inflammation by attenuation of TNF- α , IL-4, and IL-5 expression levels, and pulmonary edema by elevation of AQP1 and AQP5 expression levels in mouse model of ovalbumin-induced allergic asthma [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(8):838-845.
- [34] TAKEI Y. Comparative physiology of body fluid regulation in vertebrates with special reference to thirst regulation[J]. *Jpn J Physiol*, 2000, 50(2):171-186.
- [35] HANUKOGLU I, HANUKOGLU A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases[J]. *Gene*, 2016, 579(2):95-132.
- [36] CANESSA C M, SCHILD L, BUELL G, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits [J]. *Nature*, 1994, 367(6462):463-467.
- [37] DENG J, WANG D X, DENG W, et al. Regulation of alveolar fluid clearance and ENaC expression in lung by exogenous angiotensin II [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012, 181(1):53-61.
- [38] ABDEL HAMEID R, CORMET-BOYAKA E, KUEBLER W M, et al. SARS-CoV-2 may hijack GPCR signaling pathways to dysregulate lung ion and fluid transport [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 320(3):L430-L435.
- [39] FEI X, ZIQIAN Y, BINGWU Y, et al. Aldosterone alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by regulating epithelial sodium channel through PI3K/Akt/SGK1 signaling pathway [J]. *Mol Cell Probes*, 2021, 57:101709.
- [40] RIDGE K M, OLIVERA W G, SALDIAS F, et al. Alveolar type 1 cells express the alpha2 Na, K-ATPase, which contributes to lung liquid clearance [J]. *Circ Res*, 2003, 92(4):453-460.
- [41] MUTLU G M, SZNAJDER J I. Mechanisms of pulmonary edema clearance [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 289(5):L685-L695.
- [42] SKOU J C. Nobel lecture. The identification of the sodium pump[J]. *Biosci Rep*, 1998, 18(4):155-169.
- [43] CHINIGARZADEH A, MUNIANDY S, SALLEH N. Estrogen, progesterone, and genistein differentially regulate levels of expression of α -, β -, and γ -epithelial sodium channel (ENaC) and α -sodium potassium pump (Na⁺/K⁺-ATPase) in the uteri of sex steroid-deficient rats [J]. *Theriogenology*, 2015, 84(6):911-926.
- [44] MATTHAY M A, FOLKESSON H G, CLERICI C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(3):569-600.
- [45] OTIS J S, MITCHELL P O, KERSHAW C D, et al. Na, K-ATPase expression is increased in the lungs of alcohol-fed rats [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2008, 32(4):699-705.
- [46] INGBAR D H, WEEKS C B, GILMORE-HEBERT M, et al. Developmental regulation of Na, K-ATPase in rat lung [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(4 Pt 1):L619-629.
- [47] SALDÍAS F, LECUONA E, FRIEDMAN E, et al. Modulation of lung liquid clearance by isoproterenol in rat lungs[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(5):L694-L701.
- [48] CLERICI C, MATTHAY M A. Hypoxia regulates gene expression of alveolar epithelial transport proteins[J]. *J Appl Physiol (1985)*, 2000, 88(5):1890-1896.
- [49] WAHLANG B, MCCLAIN C, BARVE S, et al. Role of cAMP and phosphodiesterase signaling in liver health and disease[J]. *Cell Signal*, 2018, 49:105-115.
- [50] SKROBLIN P, GROSSMANN S, SCHÄFER G, et al. Mechanisms of protein kinase A anchoring[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2010, 283:235-330.
- [51] KRANE C M, TOWNE J E, MENON A G. Cloning and characterization of murine AQP5: Evidence for a conserved aquaporin gene cluster[J]. *Mamm Genome*, 1999, 10(5):498-505.
- [52] WANG W, ZHENG M. Role of cAMP-PKA/CREB pathway in regulation of AQP 5 production in rat nasal epithelium[J]. *Rhinology*, 2011, 49(4):464-469.
- [53] 张景熙, 李强, 刘忠令. AQP5的结构功能及其调节[J]. *国外医学:生理、病理科学与临床分册*, 2003, 23(6):599-601.
- [54] 李岩. 苓甘五味姜辛汤对寒饮伏肺型哮喘大鼠cAMP-PKA通路相关分子表达的影响[D]. 兰州:甘肃中医药大学, 2016.
- [55] MUSTAFA S B, CASTRO R, FALCK A J, et al. Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways mediate cAMP induction of alpha-epithelial Na⁺ channels (alpha-ENaC)[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 215(1):101-110.
- [56] HAN J, LI H, BHANDARI S, et al. Maresin conjugates in tissue regeneration 1 improves alveolar fluid clearance by up-regulating alveolar ENaC, Na, K-ATPase in lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(8):4736-4747.

[责任编辑 孙丛丛]