DOI:10.16016/j.2097-0927.202109016

黄芩苷通过 NF-κB 信号对气道上皮黏液调节因子 MUC5AC 和 CFTR 表达的影响

张 艳[1],张彩丽[1],刘 燕[1],陈玉龙[1],彭梦薇[1],桑亚洲[1],吴耀松[1,2,3] 450046 郑州,河南中医药大学中医药科学院,河南省中医方证信号传导重点实验室/河南省中医方证信号传导国际联合重点实验室[1];河南省中西医结合防治脑认知疾病工程技术研究中心[2];郑州市中西医结合防治脑认知疾病重点实验室[3]

[**摘要**] **目的** 基于核因子 κB(nuclear factor kappa B,NF-κB)信号探讨黄芩苷调控气道上皮黏蛋白 5AC(mucin 5AC, MUC5AC)和囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator,CFTR)的表达以改善病理性气道黏液的机制。**方法** 采用 MTT 法检测不同浓度黄芩苷对 H292 细胞(人肺癌细胞)活性的影响并确定用于后续实验的黄芩苷浓度;将细胞分为空白对照组、模型组、NF-κB 抑制剂组(PDTC 组,100 μmol/L)和黄芩苷组(200 μg/mL)。采用 IL-1β 诱导 H292 细胞建立体外黏液高分泌炎症细胞模型,再以相应浓度的药物干预 24 h 后,采用 ELISA 方法检测各组细胞上清中 MUC5AC、IL-8、TNF-α 的含量,检测各组细胞中 MUC5AC 和 CFTR 蛋白的含量;采用实时荧光定量 PCR 检测各组细胞中 MUC5AC 和 CFTR mRNA 的表达;采用 Western blot 检测各组细胞中 p65 和 IκB 的表达。**结果** MTT 检测结果显示,当黄芩苷浓度为 200 μg/mL 时,细胞活性在 80%以上,可作为后续实验的安全浓度。与空白对照组比较,模型组细胞培养上清及细胞质中 MUC5AC 分泌水平及 IL-8、TNF-α、p65、MUC5AC mRNA 表达均明显升高($P<0.05$),IκB 蛋白表达、CFTR 蛋白含量、CFTR mRNA 的表达显著降低($P<0.05$);与模型组比较,PDTC 组细胞培养上清中 MUC5AC 分泌水平,IL-8、TNF-α、p65 蛋白表达及 MUC5AC mRNA 表达显著降低($P<0.05$),细胞质中 MUC5AC 水平、CFTR 蛋白含量、IκB 蛋白表达、CFTR mRNA 的表达显著升高($P<0.05$);与模型组比较,黄芩苷组细胞培养上清中 MUC5AC 分泌水平、IL-8 和 TNF-α 分泌水平、p65 蛋白表达降低($P<0.01$),CFTR 蛋白含量、IκB 蛋白表达、CFTR mRNA 表达均显著增加($P<0.01$),而 MUC5AC mRNA 表达差异无统计学意义。**结论** 黄芩苷通过抑制 NF-κB 活性,减少 MUC5AC 的分泌,增加 CFTR 的表达,减轻气道炎症。

[**关键词**] 黄芩苷;NF-κB;MUC5AC;囊性纤维化跨膜传导调节因子;气道黏液
[**中图法分类号**] R285.5; R322.34; R394.6 [**文献标志码**] A

Effects of baicalin on expression of mucin 5AC and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway epithelium through NF-κB signaling pathway

ZHANG Yan[1], ZHANG Caili[1], LIU Yan[1], CHEN Yulong[1], PENG Mengwei[1], SANG Yazhou[1], WU Yaosong[1,2,3]

[1]Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome and Prescription in Signaling, Henan International Joint Laboratory of TCM Syndrome and Prescription in Signaling, Academy of Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan Province, 450046; [2]Henan Engineering Technology Research Center for Prevention and Treatment of Brain Cognitive Diseases with Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Zhengzhou, Henan Province, 450046; [3]Zhengzhou Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for the Prevention and Treatment of Brain Cognitive Diseases, Zhengzhou, Hena province, 450046, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of baicalin in improving pathological airway mucus by regulating the expression of airway epithelial mucus regulators mucin 5AC (MUC5AC) and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) through nuclear factor κB (NF-κB) signaling pathway.

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(81503490);河南省科技攻关计划(192102310160)
[**通信作者**] 吴耀松,E-mail:linawys@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Methods MTT assay was used to detect the effects of different concentrations of baicalin on the viability of human lung cancer H292 cells in order to determine the proper dose of baicalin for subsequent experiments. After H292 cells were induced by IL-1β to establish *in vitro* inflammatory cell model of mucus hypersecretion, the cells were divided into blank control group, model group, NF-κB inhibitor group (PDTC group, 100 μmol/L) and baicalin group (200 μg/mL). After 24 h of drug intervention, the contents of MUC5AC, IL-8, and TNF-α in the culture supernatant and the levels of MUC5AC and CFTR in the cytoplasm of each group were detected by ELISA. Real-time fluorescent quantitative PCR was adopted to detect the mRNA expression of MUC5AC and CFTR. Western blotting was performed to test the expression of p65 and IκB (inhibitor of NF-κB). **Results** The results of MTT assay showed that 200 μg/mL was a safe concentration of baicalin for subsequent experiments, with cell viability larger than 80%. As compared with the blank control group, the protein expression of MUC5AC, IL-8, TNF-α, p65 and the mRNA level of MUC5AC in culture supernatant and cytoplasm were all significantly increased in the model group ($P<0.05$), while the expression of IκB and CFTR proteins as well as the CFTR mRNA level were remarkably decreased ($P<0.05$). When compared with the model group, the PDTC group presented lower level of MUC5AC secretion, declined protein levels of IL-8, TNF-α and p65, as well as MUC5AC mRNA in the culture supernatant ($P<0.05$), while higher protein expression of MUC5AC, CFTR and IκB in the cytoplasm, along with elevated mRNA level of CFTR ($P<0.05$). In terms of the baicalin group, the secretion levels of MUC5AC, IL-8 and TNF-α were greatly diminished in culture supernatant ($P<0.01$) as compared with the model group, whereas the expression of IκB as well as the protein and mRNA levels of CFTR notably improved ($P<0.01$), and there was no significant difference in MUC5AC mRNA expression. **Conclusion** Baicalin reduces MUC5AC secretion and increases CFTR expression by inhibiting the activity of NF-κB, and thus attenuates airway inflammation.

[**Key words**] baicalin; NF-κB; MUC5AC; cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; airway mucus

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81503490) and the Tackling Project of Science and Technology Plan of Henan Province (192102310160). Corresponding author: WU Yaosong, E-mail: linawys@163.com

黄芩苷属于黄酮类化合物,是中药黄芩干燥根部提取的主要活性成分之一,具有抗病毒、抗氧化、解热镇痛、抗炎抗菌等药理学作用,也是多种清肺化痰中药方剂如礞石滚痰丸[1]、竹沥达痰丸[2]、清肺化痰丸[3]等经典名方的主要成分。

黏液素的重要成分 MUC5AC 是 COPD、哮喘等肺系疾病气道分泌物中最主要的凝胶形成蛋白[4-5],其高表达、高分泌严重影响了黏液的黏弹性[6],CFTR 主要位于气道上皮细胞膜上,若其功能缺陷会导致黏液的稠度增加,降低黏液的清除率和黏液运输效率[7],MUC5AC 和 CFTR 表达异常会严重影响黏液的清除,诱发气道炎症,形成气道黏液栓,二者也被认为是 COPD、哮喘等疾病的危险遗传因子。NF-κB 是多效调节气道免疫的关键转录因子,与炎性细胞因子、有丝分裂原、氧化应激、微生物感染等密切相关[8]。研究报道显示,NF-κB 可直接或间接调节 MUC5AC 和 CFTR 的表达,同时也被 CFTR 调节[9],如抑制 NF-κB 信号通路,可使 MUC5AC 表达下调[10]。

研究表明,黄芩苷对肺部疾病如肺炎、肺癌和慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmoriary disease, COPD)均有显著的治疗效果,能有效改善脂多糖诱导的气道上皮细胞黏液的高分泌[11],可以通过抑制 NF-κB 与丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路的激活,从而抑制炎症细胞和炎症介质的产生。但是其改善气道上皮黏液分泌的机制还不甚明确,是否与调控 MUC5AC 和 CFTR 的表达相关还有待深入阐明。基于此,本研究从 NF-κB 信号调控 MUC5AC 和 CFTR 基因和蛋白表达的角度对黄芩苷改善气道上皮病理性黏液的机制进行探讨,阐释黄芩苷改善气道上皮炎症的机理,为黄芩苷及以黄芩苷为主要成分的中药复方临床运用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 MUC5AC ELISA 试剂盒购于武汉云克隆科技股份有限公司(货号:SEA756Hu);CFTR

ELISA 试剂盒购于武汉云克隆科技股份有限公司(货号:SEC425Hu);IL-8 ELISA 试剂盒、TNF-α ELISA 试剂盒、IL-1β ELISA 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司(货号分别为:EK0413、EK0525、EK0525、AR1110);PDTC(NF-κB 抑制剂)购于上海碧云天生物技术有限公司(货号:1808);抗体 p65、抗体 IκB 购于美国 Abcam 公司(货号分别为:ab32536、ab32518);黄芩苷购于成都曼思特生物科技有限公司。

1.1.2 细胞培养 人气道上皮细胞 H292,购于中国科学院上海生命科学院细胞库,货号:TCHu122。RPMI1640 培养基、胰蛋白酶购于北京索莱宝科技有限公司,胎牛血清购于上海双洇生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将人气道上皮肺癌细胞 H292 培养在含 10%胎牛血清的培养基中,置于湿度为 95%,温度为 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,后续 ELISA、Western blot 和 PCR 实验分组为:空白对照组、模型组、PDTC 组、黄芩苷组。

1.2.2 药物的配制及给药方法 IL-1β 溶液的配制及 PDTC(NF-κB 抑制剂)溶液的配制方法和浓度参照前期实验[12]。黄芩苷溶液的配制:称取 10 mg 黄芩苷粉末于 4 mL EP 管中,加入 2 mL RPMI1640 培养基,震荡混匀,得到终浓度为 5 mg/mL 的黄芩苷溶液,过滤除菌后分装冻存于 -80 ℃ 冰箱,使用时以 RPMI1640 稀释成所需工作浓度,并加入 10%的胎牛血清。

1.2.3 IL-1β 诱导 H292 细胞建立黏液高分泌炎症细胞模型 根据文献[13]报道的方法建立黏液高分泌炎症细胞模型。当细胞培养至对数生长期时,胰蛋白酶消化后,将细胞在含 5%胎牛血清 RPMI1640 中培养 24 h 后,以 PBS 冲洗细胞表面,加入 5 ng/mL 的 IL-1β 溶液(RPMI1640 稀释)处理 24 h[14]。

1.2.4 MTT 法检测黄芩苷对 H292 细胞生长的影响 取对数生长期 H292 细胞株接种于 96 孔板(10^4/孔),实验设置空白对照组、黄芩苷各浓度组(50、100、200、400 μg/mL),每组设置 5 个复孔。待细胞贴壁后,每孔加入相应药液 200 μL,空白对照组加入同体积的完全培养基,于 CO_2 培养箱中继续培养 24 h 后,采用 MTT 法于酶标仪 570 nm 波长下检测孔光密度值 $D(570)$,并计算出细胞抑制率。

1.2.5 ELISA 法检测黄芩苷对 H292 细胞中 MUC5AC、IL-8、TNF-α 及合成 CFTR 蛋白的影响 细胞培养和造模处理方法同上。实验设空白对照组、模型组、PDTC 组、黄芩苷组,每组设置 5 个复孔,收集各组细胞及培养上清,ELISA 法检测细胞内和培养上清中黏蛋白 MUC5AC 的含量,计算 MUC5AC 胞外分泌量占胞外与细胞质分泌量的总量百分比;收集各组培养上清,ELISA 法检测培养上清中 IL-8、TNF-α 的含量,收集各组细胞,ELISA 法检测各组细胞中 CFTR 蛋白的含量。详细步骤严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.2.6 PCR 法检测黄芩苷对 H292 细胞中 MUC5AC 和 CFTR mRNA 表达的影响 细胞培养、造模及分组方法同 1.2.5。收集各组细胞,于低温超净工作台内以 TRIzol reagent 试剂分别提取各组细胞总 RNA,并以高容量 cDNA 逆转录试剂盒合成 cDNA,再进行 PCR 扩增。PCR 扩增具体引物序列如下:CFTR 5′-GAGAAAAAGGGTTGAGCGG-3′(上游),5′-TCTTTCCGAAGCTCGGTTGG-3′(下游),186 bp;MUC5AC 5′-AGTGTCCCCCATGCACTGA3′(上游),5′-ACACCCTCCACAAGAAAGCG-3′(下游),165 bp。

1.2.7 Western blot 法检测黄芩苷对 H292 细胞中 p65、IκB 蛋白表达的影响 细胞造模、分组和处理方法同 1.2.5。运用组织蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白,并以 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测各组总蛋白浓度。蛋白质在 10% SDS-PAGE 凝胶上分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,膜以 5%的脱脂牛奶溶液封闭 2 h 后,孵育一抗(p65,1∶1 000;IκB,1∶1 000)于 4 ℃过夜,取出膜以 TBST 洗脱后,孵育二抗(β-actin,1∶2 000),使用化学发光(ECL)法获得蛋白条带,并采用 GIS1D4.2 图像分析软件测量蛋白条带的光密度,并计算其与 β-actin 内参条带的比值,用于统计分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行样本的方差齐性检验和正态性检验,以 $\bar{x}\pm s$ 对结果进行描述,符合正态分布和组间方差齐性的数据资料采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验,如数据资料不符合正态分布或方差不齐则采用 Dunnett T3 方法进行检验以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芩苷干预浓度对 H292 细胞活性的影响

MTT 检测结果显示:与空白对照组比较,黄芩苷

200 μg/mL 组、400 μg/mL 组细胞的 D(570)值显著降低,具有显著差异(P<0.05),见表 1。结果提示,黄芩苷浓度为 200 μg/mL,干预 24 h 时,细胞可保持 80%以上的活性,且前期实验结果显示黄芩苷对 H292 细胞活性有一定的浓度依赖性,因此将 200 μg/mL 的黄芩苷作为后续 ELISA、Western blot 和 PCR 实验的干预浓度。

表 1 MTT 法检测不同浓度黄芩苷对 H292 细胞增殖的影响

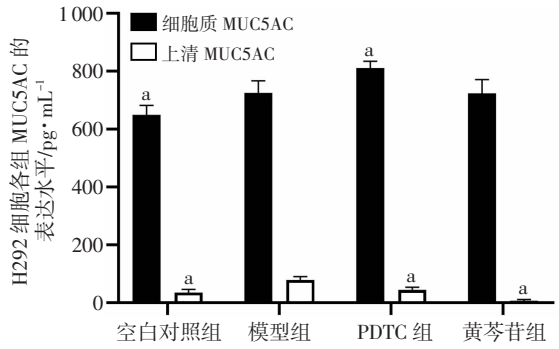
($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	D(570)值	抑制率(%)
空白对照组	0.962±0.016	
50 μg/mL 组	1.026±0.049	-6.6
100 μg/mL 组	0.954±0.027	0.9
200 μg/mL 组	0.776±0.012[a]	19.3
400 μg/mL 组	0.372±0.015[a]	61.3

a:P<0.05,与空白对照组比较

2.2 黄芩苷对 H292 细胞中 MUC5AC、IL-8、TNF-α、合成 CFTR 及 p65、IκB 表达的影响

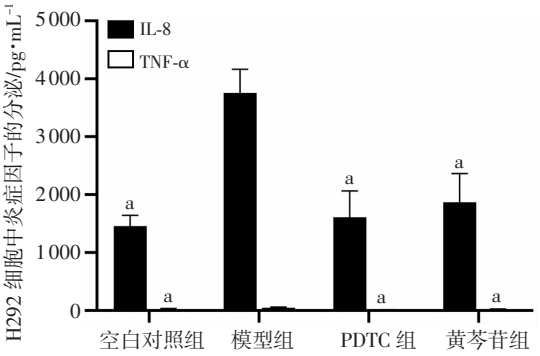
2.2.1 黄芩苷对 H292 细胞分泌黏蛋白 MUC5AC 的影响 ELISA 检测结果显示:与空白对照组比较,模型组细胞培养上清及细胞质中 MUC5AC 分泌水平均明显升高(P<0.05);与模型组比较,PDTC 组培养上清中 MUC5AC 水平降低,细胞质中 MUC5AC 水平显著升高(P<0.05);与模型组比较,黄芩苷组培养上清中 MUC5AC 水平降低(P<0.05),见图 1。



a:P<0.05,与模型组比较

图 1 ELISA 检测 H292 细胞各组 MUC5AC 的表达水平

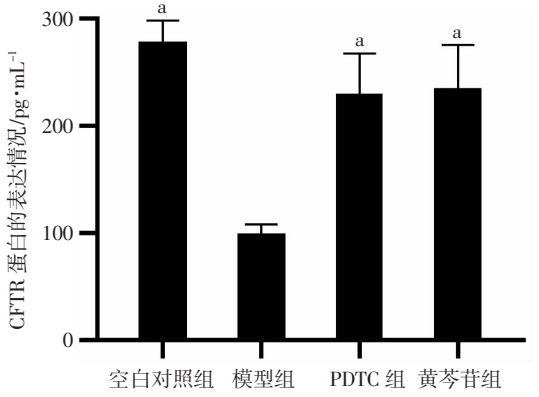
2.2.2 黄芩苷对 H292 细胞分泌炎症因子 IL-8 和 TNF-α 的影响 ELISA 检测结果显示:与空白对照组比较,模型组 IL-8 及 TNF-α 分泌水平显著升高(P<0.05);与模型组比较,PDTC 组 IL-8、TNF-α 分泌水平显著降低(P<0.05),黄芩苷组 IL-8 和 TNF-α 分泌水平均显著降低(P<0.05),见图 2。



a:P<0.05,与模型组比较

图 2 ELISA 法检测黄芩苷对 H292 细胞炎症因子 IL-8、TNF-α 分泌的影响

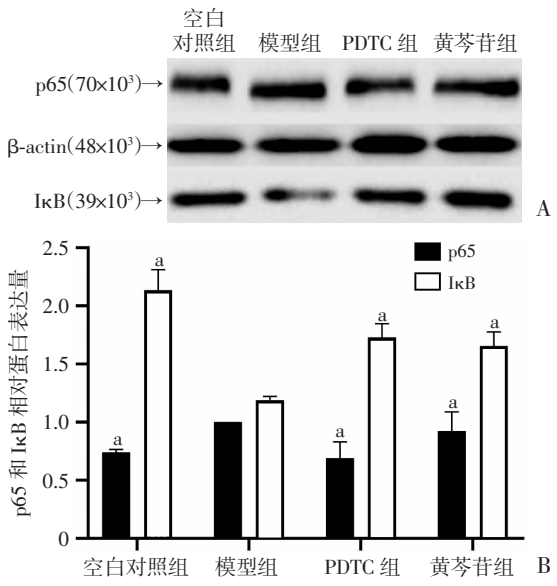
2.2.3 黄芩苷对 H292 细胞中 CFTR 蛋白含量的影响 ELISA 检测结果显示:与空白对照组比较,模型组、PDTC 组、黄芩苷组细胞中 CFTR 蛋白含量显著降低(P<0.05);与模型组比较,PDTC 组和黄芩苷组细胞中 CFTR 蛋白含量显著增加(P<0.05);与 PDTC 组比较,黄芩苷组细胞中 CFTR 蛋白含量无显著差异(P>0.05),见图 3。



a:P<0.05,与模型组比较

图 3 ELISA 检测黄芩苷对 H292 细胞中 CFTR 蛋白含量的影响

2.2.4 黄芩苷对 H292 细胞中 p65、IκB 蛋白表达的影响 Western blot 检测结果显示:与空白对照组比较,模型组细胞中 p65 蛋白表达显著升高(P<0.05),而 IκB 蛋白表达显著降低(P<0.05);与模型组比较,PDTC 组和黄芩苷组 p65 蛋白表达均显著降低(P<0.05),且 IκB 蛋白表达均显著增加(P<0.05),见图 4。

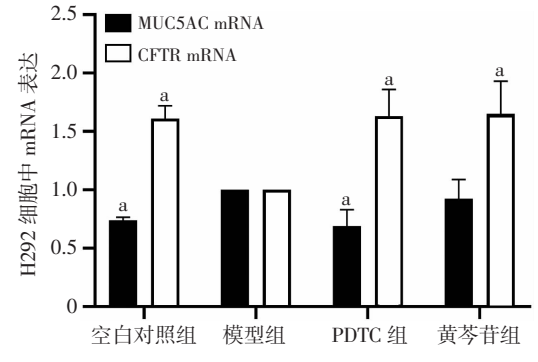


a:$P<0.05$,与模型组比较

图 4 Western blot 检测黄芩苷对 H292 细胞蛋白表达的影响

2.3 黄芩苷对 H292 细胞中 MUC5AC 和 CFTR mRNA 表达的影响

实时荧光定量 PCR 检测结果显示:与空白对照比较,模型组 MUC5A mRNA 表达明显升高($P<0.05$),CFTRmRNA 的表达显著降低($P<0.05$);与模型组比较,PDTC 组 MUC5AC mRNA 表达显著降低($P<0.05$),CFTR mRNA 的表达显著升高($P<0.05$);与模型组比较,黄芩苷组细胞 CFTR mRNA 表达显著升高($P<0.05$),而 MUC5AC mRNA 表达无显著差异($P>0.05$),见图 5。



a:$P<0.05$,与模型组比较

图 5 实时荧光定量 PCR 检测黄芩苷对 H292 细胞 MUC5AC mRNA、CFTR mRNA 表达的影响

3 讨论

黄芩,味苦性寒,归肺经,擅治呼吸系统疾病,具有清热燥湿,泻火解毒的功效,《别录》记载它可疗痰热,《本草正》则曰:“枯者清上焦之火,消痰利气,定喘嗽”。黄芩苷(baicalin)是黄芩干燥根提取分离的主要成分之一,属于黄酮类化合物[15],大量研究表明,黄芩苷对肺部疾病如肺损伤、肺炎、肺癌和 COPD 均有一定的治疗效果,本研究基于体外气道炎症高分泌细胞模型对黄芩苷改善气道病理性黏液的机制进行了初步探索。已有研究发现,黄芩苷能诱导人结肠癌 SW480 细胞凋亡并抑制其增殖,且与黄芩苷的浓度呈量效关系[16],这意味着黄芩苷发挥其药物功效可能与细胞类型和药物浓度密切相关。本研究首先确定了可用于实验的黄芩苷的合适浓度,研究结果表明,当黄芩苷使用浓度 200 μg/mL 时,H292 细胞的活力高于 80%,因此,认为该浓度用于后续细胞实验是最合适的安全浓度。

气道黏液高分泌是慢性支气管炎、哮喘、慢性鼻窦炎等多种慢性呼吸道疾病的重要病理学特征,以痰多、咳嗽为主要临床表现,并常伴有气流受限和肺功能的下降。根据其痰多、黏稠、不易咳出特点,可归属为中医痰证“有形之痰”的“热痰证”范畴[17]。其主要病机是痰阻气滞,气郁化火,痰热互结,治疗应先要清气化痰,中药黄芩可以有效清肺热、化痰结,使气机顺畅则亢盛之火自降,达到火退则安,火清痰消的效果。

临床研究发现,IL-1β 是启动和维持机体气道上皮炎性反应最重要的细胞因子之一[18],IL-1β 与 H292 细胞共培养后可诱导细胞 MUC2 基因表达和黏蛋白分泌增加,并介导黏蛋白分泌相关的信号通路[19]。因此,根据文献报道及前期研究基础的方法[13-14],本研究运用浓度为 5 ng/mL 的 IL-1β 诱导 H292 细胞 24 h 后,H292 细胞所分泌上清中的 MUC5AC 含量最高,成功复制了黏液高分泌炎症细胞模型,并对 IL-1β 诱导后的 H292 细胞分泌炎症介质功能及黄芩苷对其的调节作用进行了观察,研究结果显示,模型组 H292 细胞分泌 IL-8 和 TNF-α 的量均显著增加,黄芩苷和 PDTC 可显著抑制 H292 细胞中 IL-8 和 TNF-α 的表达,降低气道上皮黏液中 IL-8、TNF-α、IL-1β 等细胞因子和炎症介质的表达,且黄芩苷具有降低以上炎症因子高分泌水平、减轻炎症反应的药理作用[20-21]。MUC5AC 和 CFTR 的表达异常和功能障碍是影响黏液理化性质和清除难易程度的关键因素,受 NF-κB 信号调控,而且在 MUC5AC 启动子区(-3594)和 CTFR 启动子区(-1103)有 NF-κB 结合位点[22],多种因素如金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、肺炎支原体、流感病毒、鼻病毒等均能激活 NF-κB 促进 MUC5AC 的转录和合成,增加黏液分泌[23]。适当的 MUC5AC 表达有助于宿主防御,发

挥清除呼吸道粘纤毛的作用,但其过表达,尤其是在CFTR功能缺陷时会导致气道清除出现缺陷和障碍,被认为是肺疾病的加重因素。本研究结果观察到,当使用IL-1β刺激H292细胞24 h后,细胞CFTR蛋白含量显著降低,而细胞质内合成和细胞外分泌的MUC5AC含量显著升高,与此同时,细胞中NF-κB的P56亚基表达显著上调,而IκB(NF-κB抑制物)的表达也显著降低,而此次研究观察到的结果也被同类相关研究进一步证实[24-25]。

综上所述,根据前期研究报道和本研究结果可知,IL-1β可诱导H292细胞黏液高分泌行为,其机制可能与IL-1β激活NF-κB信号,促进MUC5AC的分泌并同时抑制CFTR的合成有关,而黄芩苷可对以上病理改变起到积极的治疗作用,其机制与抑制NF-κB活性,减轻气道炎症反应,改善MUC5AC的分泌和增加CFTR的表达和功能有关。黄芩苷为中药黄芩的提取物,在治疗肺部疾病上发挥着重要作用,具有便、廉、验的明显优势,且副作用小,本研究可为黄芩苷应用于临床治疗呼吸道及肺部疾病提供研究前期基础和借鉴。但本研究仅通过体外实验研究黄芩苷对病理性气道黏液高分泌的作用机制,尚缺乏体内实验研究,下一步还将运用动物实验进一步验证,以期为临床应用提供参考思路与依据。

参考文献:

[1] 贾善学, 王洪星, 刘桂华, 等. RP-HPLC法测定礞石滚痰丸中黄芩苷的含量[J]. 中国药事, 2003, 17(3): 169-170.
JIA S X, WANG H X, LIU G H, *et al*. Content determination of baicaline in Mengshiguntan Pill by RP-HPLC[J]. Chin Pharm Aff, 2003, 17(3): 169-170.

[2] 张浚, 张昌斌, 王锦绣. 反相高效液相色谱法测定竹沥达痰丸中黄芩苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 1977-1978.
ZHANG J, ZHANG C B, WANG J X. Determination of baicalin in zhulidatan pills by HPLC[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2008, 19(8): 1977-1978.

[3] 陆丽娜, 董加花, 左艳华, 等. RP-HPLC法同时测定清肺化痰丸中4种成分[J]. 中成药, 2016, 38(9): 1956-1959.
LU L N, DONG J H, ZUO Y H, *et al*. Simultaneous determination of four constituents in Qinfei Huatan Pills by RP-HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(9): 1956-1959.

[4] 屈飞, 吴汉松, 邱沙英, 等. 清肺化痰汤通过抑制EGFR通路下调MUC5AC的表达治疗COPD的研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 69-75. DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2020.04.003.
QU F, WU H S, QIU S Y, *et al*. Treatment for COPD with qingfei huatan decoction by down regulating the expression of MUC5AC through EGFR pathway[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(4): 69-75. DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2020.04.003.

[5] 杨勤军, 王心恒, 杨程, 等. 麻芍平喘汤对哮喘大鼠气道重塑和气道炎症及肺组织TGF-β1、Muc5AC蛋白表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(5): 154-159, 64. DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2020.05.017.
YANG Q J, WANG X H, YANG C, *et al*. Effects of Mashao Pingchuan decoction on airway remodeling, airway inflammation, expressions of TGF-β1 and Muc5AC in lung tissues of asthmatic rats[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(5): 154-159, 64. DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2020.05.017.

[6] LILLEHOJ E P, KATO K, LU W, *et al*. Cellular and molecular biology of airway mucins[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2013, 303: 139-202. DOI: 10.1016/b978-0-12-407697-6.00004-0.

[7] COLLAWN J F, MATALON S. CFTR and lung homeostasis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 307(12): L917-L923. DOI:10.1152/ajplung.00326.2014.

[8] HAYDEN M S, GHOSH S. Shared principles in NF-kappaB signaling[J]. Cell, 2008, 132(3): 344-362. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.020.

[9] RAMACHANDRAN S, KARP PH, OSTERHAUS S R, *et al*. Post-transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by microRNAs[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(4): 544-551. DOI:10.1165/rcmb.2012-0430OC.

[10] 刘书宇, 王树鹏. 基于NF-κB信号通路探讨麻黄细辛附子汤对变应性鼻炎大鼠MUC5AC和MUC5B表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(12): 41-43. DOI:10.13194/j.issn.1673-842x.2019.12.010.
LIU S Y, WANG S P. Exploring the effect of Mahuang Xixin Fuzi decoction on the expression of MUC5AC and MUC5B in rats with allergic rhinitis based on NF-kappa B signaling pathway[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2019, 21(12): 41-43. DOI:10.13194/j.issn.1673-842x.2019.12.010.

[11] 刘立涛. 清热解毒类中药活性成分治疗慢性阻塞性肺病模型的筛选及作用机制探讨[D]. 吉首: 吉首大学, 2020.
LIU L T. Screening of the active components of Chinese medicine for clearing away heat and detoxification in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease and its

mechanism[D]. Jishou, China: Jishou University, 2020.

[12] 张培旭. 基于 NF-κB 信号通路研究小青龙汤对肺癌 H292 细胞分泌 MUC5AC 的调控机制[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2018.
ZHANG P X. Study on the regulation mechanism of xiaoqinglong decoction on MUC5AC secretion in lung cancer H292 cells based on NF-κB signaling pathway [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2018.

[13] LEE E J, SONG K J, KWON J H, *et al*. Chronic cholesterol depletion by lovastatin suppresses MUC5AC gene expression in human airway epithelial cells[J]. Am J Rhinol Allergy, 2014, 28(3): e125-e129. DOI: 10.2500/ajra.2014.28.4037.

[14] 蒋时红,贺倩文,张培旭,等. 基于核转录因子-κB 信号通路研究小青龙汤对肺癌 H292 细胞分泌黏蛋白 5AC 的调控机制[J]. 中国中西医结合急救杂志,2020,27(6):733-737. DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2020.06.025.
JIANG S H, HE Q W, ZHANG P X, *et al*. Regulatory mechanism of Xiaoqinglong Decoction on mucin 5AC secretion in lung cancer H292 cells based on nuclear transcription factor-κB signaling pathway[J]. Chin J TCM WM Crit Care,2020,27(6):733-737.

[15] CAO Y G, MAO X Y, SUN C Y, *et al*. Baicalin attenuates global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways[J]. Brain Res Bull, 2011, 85(6): 396-402. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2011.05.002.

[16] 张淑华, 官学苹, 阮奇军, 等. 黄芩苷对人结肠癌 SW480 细胞增殖和凋亡的影响及机制研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(21): 2299-2304.
ZHANG S H, GUAN X P, RUAN Q J, *et al*. Study on the effect of baicalin on proliferation and apoptosis of human colon cancer SW480 cells and its mechanism[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2021, 30(21): 2299-2304.

[17] 辛文妤, 宋俊科, 何国荣, 等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(6): 647-653,659.
XIN W Y, SONG J K, HE G R, *et al*. Progress in pharmacological study and the underlying mechanism of baicalein and baicalin[J]. Chin J New Drugs, 2013, 22(6): 647-653,659.

[18] LAPPALAINEN U, WHITSETT J A, WERT S E, *et al*. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(4): 311-318. DOI:10.1165/rcmb.2004-0309OC.

[19] KIM Y D, JEON J Y, WOO H J, *et al*. Interleukin-1beta induces MUC_2 gene expression and mucin secretion via activation of PKC-MEK/ERK, and PI3K in human airway epithelial cells[J]. J Korean Med Sci, 2002, 17(6): 765-771. DOI:10.3346/jkms.2002.17.6.765.

[20] 李亚, 王洋, 毛静, 等. 补肺益肾方调控 NF-κB 信号通路对 COPD 大鼠炎性反应的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3171-3175.
LI Y, WANG Y, MAO J, *et al*. Effects of Bufei Yishen Formula on lung inflammation via NF-κB signaling pathway in rats with COPD[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(6): 3171-3175.

[21] 周必英, 周泠. 黄芩苷对卡氏肺孢子虫肺炎大鼠 TNF-α 和 IL-8 影响[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(10): 1250-1251.
ZHOU B Y, ZHOU L. Influence of baicalin on tumour necrosis factor-α and interleukin-8 in rats infected with Pneumocystis carinii pneumonia[J]. Chin J Public Heal, 2009, 25(10): 1250-1251.

[22] BROIDE D H, LAWRENCE T, DOHERTY T, *et al*. Allergen-induced peribronchial fibrosis and mucus production mediated by IkappaB kinase beta-dependent genes in airway epithelium[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(49): 17723-17728. DOI: 10.1073/pnas.0509235102.

[23] SIKDER M A, LEE H J, MIA M Z, *et al*. Inhibition of TNF-α-induced MUC5AC mucin gene expression and production by wogonin through the inactivation of NF-κB signaling in airway epithelial cells[J]. Phytother Res, 2014, 28(1): 62-68. DOI:10.1002/ptr.4954.

[24] XU X L, HUANG H M, YIN X Y, *et al*. Effect of Lentivirus-mediated CFTR overexpression on oxidative stress injury and inflammatory response in the lung tissue of COPD mouse model [J]. Biosci Rep, 2020, 40(1): BSR20193667. DOI:10.1042/BSR20193667.

[25] WU S, LI H, YU L, *et al*. IL-1β upregulates Muc5ac expression via NF-κB-induced HIF-1α in asthma [J]. Immunol Lett, 2017,192:20-26. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.10.006.

(**收稿**:2021-09-02;**修回**:2021-11-03)

(编辑 吴培红)