

呼吸道张力收缩、浆液分泌的调控机制 及柚皮苷在此过程中的调节作用*

师瑞, 王永刚, 李沛波, 彭维, 苏薇薇

中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

摘要: 综述了呼吸道平滑肌张力收缩调控机制、咳嗽变异性哮喘疾病及治疗研究进展、呼吸道上皮浆液分泌调控机制, 以及柚皮苷对呼吸道张力收缩及浆液分泌的调控机制研究进展, 为其临床应用提供依据。

关键词: 柚皮苷; 呼吸道; 张力收缩; 浆液分泌; 调控机制

中图分类号: R961;R974 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137(2022)04-0001-10

Regulation mechanism of airway contraction and surface liquid secretion and regulation effect of naringin in this process

SHI Rui, WANG Yonggang, LI Peibo, PENG Wei, SU Weiwei

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: This article reviews the regulation mechanism of airway smooth muscle contraction, the progress on the research and treatment of cough variant asthma, the regulation mechanism of airway epithelial liquid secretion, and the progress on the effects of naringin on the airway contraction and surface liquid secretion, highlighting the potential of naringin for its clinical application.

Key words: naringin; airway; contraction; surface liquid secretion; regulation mechanism

柚皮苷是本团队研究开发的一类新药, 具有显著的止咳、化痰、消炎作用, 已实施科技成果转化。我们的研究还证实: 柚皮苷对烟熏所致的豚鼠慢性病理性咳嗽及卵白蛋白(OVA, ovalbumin)介导的豚鼠咳嗽变异性哮喘具有显著作用, 柚皮苷能显著抑制大鼠气道黏蛋白的合成与分泌以及

气道上皮杯状细胞的增生。本文综述了呼吸道平滑肌张力收缩调控机制、咳嗽变异性哮喘疾病及治疗研究进展、呼吸道上皮浆液分泌调控机制, 以及柚皮苷对呼吸道张力收缩及浆液分泌的调控机制研究进展, 为其临床应用提供思路与依据。

* 收稿日期: 2021-08-21

录用日期: 2021-10-13

网络首发日期: 2021-11-12

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金区域联合基金(2020A1515111097); 化州市化橘红国家现代农业产业园创建项目-化橘红产业科技协同创新平台建设项目

作者简介: 师瑞(1990年生), 男; 研究方向: 药理学; E-mail: shir23@mail.sysu.edu.cn

通信作者: 苏薇薇(1959年生), 女; 研究方向: 创新药物研制、中药上市后再评价及中药国际化;

E-mail: lssww@mail.sysu.edu.cn

苏薇薇, 教授、博士生导师; 广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心主任, 现任世界中医药学会联合会网络药理学专业委员会副会长, 广东省中医药学会网络药理学专业委员会主任委员。研究领域为创新药物研制、中药上市后再评价及中药国际化; 发表论文400余篇(其中SCI收录150篇); 出版专著23部(第一著者); 获得中国发明专利授权83件, 国际专利授权9件。

1 呼吸道平滑肌张力收缩调控机制

气道直径和气流阻力与呼吸道平滑肌细胞的活性密切相关,平滑肌细胞可以通过抵抗外加负荷维持呼吸道容积的稳定性,控制肺死腔的大小以协助肺部收缩,呼出气体和异物,调整呼吸道直径,并适应咳嗽^[1]。

1.1 呼吸道平滑肌细胞收缩机制

呼吸道平滑肌细胞以“肌丝滑动”原理进行收缩,在收缩过程中平滑肌细胞胞内 Ca^{2+} 浓度是调控收缩的关键因素,它和钙调蛋白结合,进一步调控收缩过程^[2-3]。胞内 Ca^{2+} 浓度的增加依赖于钙库中 Ca^{2+} 的释放以及胞外离子经 Ca^{2+} 通道的转运^[2]。质膜受体被信号分子激活,经G蛋白偶联受体调控IP3/DAG下游通路,激活钙库上 Ca^{2+} 通道及蛋白激酶C(PKC),通过钙库中 Ca^{2+} 释放及PKC级联反应升高胞内 Ca^{2+} 浓度;信号分子也可激活膜上离子通道,诱导动作电位产生,引起质膜去极化,激活电压门控 Ca^{2+} 离子通道(VOCC, voltage-gated calcium channel)等,引起胞外 Ca^{2+} 内流,升高胞内 Ca^{2+} 浓度,产生收缩效应^[4]。

1.2 呼吸道平滑肌细胞舒张机制

平滑肌细胞的舒张方式可分为:上皮依赖和非上皮依赖。胞内 Ca^{2+} 浓度降低引起肌球蛋白轻链激酶(MLCK)失活,同时激活肌球蛋白轻链磷酸酶(MLCP),进一步导致平滑肌舒张。

1.2.1 上皮依赖 研究发现上皮能够缓解平滑肌收缩。上皮能够释放PGE2、NO等上皮源舒张因子(EpDFR)调控平滑肌舒张^[5-6]。上皮对平滑肌的舒张作用主要通过鸟苷酸(GMP)途径,鸟苷酸环化酶(GC)分布于质膜和胞质中,NO和硝基类物质激活胞浆中的GC,心房利钠肽(ANP)激活质膜上的GC。通过上皮释放的舒张因子激活GC,使之催化GTP形成cGMP,进一步激活钾离子通道引起质膜超极化的同时促进 Ca^{2+} 进入钙库降低其浓度,此外cGMP依赖的激酶能够改变MLCK、MLCP的活性达到舒张作用。

1.2.2 非上皮依赖 呼吸道平滑肌细胞移除胞内 Ca^{2+} 的机制主要包括:cAMP途径和激活阳离子通道途径。cAMP途径:信号分子引起胞内cAMP浓度增加,进一步活化蛋白激酶A(PKA),调控下游通路舒张平滑肌。这些影响主要包括:抑制磷酸肌醇水解为IP3;增加内质网和线粒体的 Ca^{2+} 摄取;使MLCK失活;激活细胞质膜上的阳离子通

道和转运体引起膜超极化等。激活阳离子通道途径:能使质膜超极化,阻碍电压门控钙离子通道(VGCC)开放;激活钠钾泵(Na^+/K^+ -ATPase),降低胞内钠离子,促进钠钙交换体(NCX)运作;调节并影响胞内 Ca^{2+} 的释放^[7]。总的来说,激活钾离子通道使膜超极化和拮抗钙通道阻止钙内流是主要的两个舒张途径^[2,8]。

2 大电导钙激活钾离子通道介导的呼吸道平滑肌张力收缩调控作用

阳离子通道中钾离子通道对平滑肌细胞电稳定影响非常大,钾离子通道(potassium ion channel)是指通透特异性仅允许 K^+ 通过质膜的通道。当 K^+ 通道被激活后,引起 K^+ 外流,胞内降低的 K^+ 浓度引起呼吸道平滑肌细胞超极化,阻碍电压门控 Ca^{2+} 通道,同时激活钠钙交换体运作降低胞内钠离子,促进 Ca^{2+} 浓度降低,抑制气道平滑肌收缩,进而促进呼吸道平滑肌舒张,降低气道组织张力。

大电导钾离子通道(BK)和ATP敏感钾离子通道(KATP)是机体中起主要作用的两类 K^+ 通道。BK被胞内信使cAMP、cGMP和钙升高所激活,被蝎毒素(IbTX)所抑制^[7,9];ATP敏感的 K^+ 通道被胞内ATP的降低所激活,被磺脲类药物如格列本脲(Glibenclamide)所抑制^[10-11]。

大电导钙激活钾离子通道(BK_{Ca} , large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel)中 K^+ 转运孔道由4个相同的 α 亚基组成^[12],同时还有一个 β 亚基调控通道活性。每个 α 亚基由7个跨膜片段(S0~S6)组成^[13-14],其中S1~S6片段与其他电压门控钾离子通道的S1~S6片段类似;S5、S6片段形成选择性通透 K^+ 的孔道;S4片段存在电压敏感区域,通过其中的一系列带电残基感测跨膜电压;相对独立的S0片段为通道提供胞外的N末端^[13-16],并与 β 1亚基形成重要的相互作用^[17-21]。每个通道 α 亚基的剩余部分由一对串联的 K^+ 电导调节器片段组成,该结构域形成通道的胞质 Ca^{2+} 传感器^[22-25]。平滑肌细胞BK通道共表达 β 1亚基,有助于增强表观 Ca^{2+} 敏感性^[26-32]。

BK_{Ca} 能够被胞内 Ca^{2+} 浓度和质膜去极化协同激活,产生外向 K^+ 大电流使得细胞膜快速超极化,进而恢复膜电位稳定^[33-35]。 BK_{Ca} 在细胞生理学功能中起着连接胞质钙离子信号和质膜电信号的作用,其结构功能的异常会引起多种疾病^[27,36-42]。

3 咳嗽变异性哮喘疾病及治疗研究进展

随着临床研究的深入,发现很多呼吸系统疾病都与平滑肌细胞结构功能改变相关。从收缩表型,逐渐转变为增殖、合成和分泌型,通过细胞结构的改变对呼吸功能产生严重影响。由于病毒细菌的侵入,产生呼吸道损伤,平滑肌自我修复功能增强,凋亡减少数目增多引起收缩张力增强,产生呼吸道平滑肌强直收缩,表现为哮喘、呼吸窘迫等症状。此外平滑肌收缩蛋白及激酶表达发生变化,对外界刺激产生的收缩反应更敏感,因此很弱的刺激都能引发呼吸道明显的收缩现象,表现为咳嗽等症状。从细胞结构和功能上表现为骨架蛋白和收缩蛋白结构的重排、 K^+ 通道活性的降低以及 Ca^{2+} 通道活性的增强,引起细胞收缩张力的增加以及兴奋阈值的降低,从而产生高强直收缩及气道高反应性等异常收缩特性,以此产生更早更强烈的收缩反应同时对抗生理舒张物质的调控,表现为咳嗽敏感性增加、哮喘等症状。

咳嗽变异性哮喘(CVA, cough variant asthma)是一种变异形式的哮喘,强烈刺激性干咳是其唯一临床表现,一般持续6~8周,30%~40%的患者可能发展为典型哮喘^[43-46]。CVA患者虽然没有气喘、气促等症状,但表现出气道高反应性,并对舒张呼吸道平滑肌的支气管扩张剂表现出显著反应^[47-51]。靶向作用于呼吸道平滑肌的支气管扩张剂是目前临床治疗CVA常用的有效策略,通过舒张平滑肌,调节呼吸道张力,起到治疗的作用。对呼吸道平滑肌具有舒张作用的药物对CVA疾病均有一定的治疗效果^[47,50]。因为 BK_{Ca} 通道可以介导较大的外向 K^+ 电流,引起呼吸道平滑肌超极化,舒张平滑肌^[52-53],因此 BK_{Ca} 通道是调节支气管舒张过程中常用的药物靶点^[7]。针对于支气管收缩异常,最常见的治疗方法是激活 BK_{Ca} 通道。

近年来,开发小分子靶点支气管扩张剂的研究正在兴起,天然产物作为丰富的化合物资源库,是CVA治疗的有效策略,其研究广受关注。

4 呼吸道上皮浆液分泌调控机制

覆盖在呼吸道表面具有黏附功能的呼吸道表面液体(ASL, airway surface liquid)在机体防御功能中发挥重要作用。ASL分为黏液层(ML, mucus layer)和纤毛周液层(PCL, periciliary fluid layer),具有黏性的ML覆盖在与上皮细胞接触的PCL

上^[54]。ML约厚5~10 μm ,含有大量的水、盐、黏膜下腺体及杯状细胞分泌的黏蛋白等物质,具有一定黏弹性,能够捕捉吸入的异物,黏蛋白含量决定了ASL的黏稠度。同时ML中含有大量防御素能够抑制细菌增长,保护机体。PCL由呼吸道上皮细胞和黏膜下腺体分泌,因含水量较高而具有较ML低的黏度,因此具有流动性,是纤毛清除呼吸道尘埃和细菌的介质。PCL约厚6 μm ,高度与纤毛一致,纤毛穿过PCL后尖端接触到黏液层,通过定向摆动能够有效地带动ML流动,排出黏附的粉尘细菌等异物。ASL的深度、成分和黏度是纤毛清除、杀菌活性、上皮细胞和免疫细胞功能的重要决定因素^[54]。

按照分泌部位和黏蛋白含量的不同,在临床上又将气道分泌液分为浆液和黏液,对应ASL,浆液即为PCL由上皮细胞和黏膜下腺体分泌,黏液即为ML由杯状细胞及腺体分泌。黏膜下腺体中的浆液细胞处于腺泡结构最远端,能够分泌 Cl^- 和 HCO_3^- ,引起浆液分泌增加,分泌的浆液是黏液流动排出的载体。在浆液分泌过程中离子转运所引起的渗透压改变起着至关重要的作用,其中 Cl^- 占主要地位,通过离子转运体将胞内离子定向排出到细胞顶膜面引起渗透压梯度改变,从而引起水分通过细胞旁路以及水通道蛋白(AQPs)发生自渗透压低浓度向高浓度的定向扩散,完成浆液分泌过程。由此可知, Cl^- 通道和AQPs对呼吸道浆液分泌起重要地位,由于 Cl^- 浓度的改变才能引起水分经AQPs的转运,因此 Cl^- 通道的活性及表达对于浆液分泌来说占主导地位。

5 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白介导的呼吸道上皮浆液分泌调控作用

离子通道、转运蛋白以及质子泵位于上皮细胞顶膜面和基底膜面上,共同决定了电解质的吸收和分泌以及上皮细胞分泌的液体体积。 Cl^- 分泌吸收对于呼吸道浆液调控起着关键作用,呼吸道上皮细胞存在 Cl^- 的双向流动,细胞间 Cl^- 通透性较大,顶膜面分布着囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)和 Ca^{2+} 激活 Cl^- 通道($CaCC$, Ca^{2+} -activated Cl^- channel),基底膜主要由钠钾氯共转运体(NKCC, sodium potassium chloride cotransporter)组成。NKCC将 Cl^- 经基底膜转运入胞内,引起胞内

Cl⁻浓度增加, Cl⁻顺浓度梯度扩散至顶膜面, 经顶膜面 CFTR 及 CaCC 排出细胞, 完成 Cl⁻定向跨膜分泌过程。此时基底膜面的 Na⁺经钠钾泵 (Na⁺/K⁺-ATPase) 转运排出胞外, 以维持胞内 Na⁺低浓度, 为底膜 Cl⁻吸收提供能量。K⁺经基底膜面 K⁺通道排出胞外, 建立了电化学梯度, 为 Cl⁻从顶膜排出提供动力。顶膜面分泌的 Cl⁻增加引起渗透压梯度改变, 从而引起水分通过细胞旁路以及 AQP_s 发生自渗透压低浓度向高浓度的定向扩散, 完成浆液分泌过程^[55]。

呼吸道上皮细胞顶膜面 CFTR 是 Cl⁻分泌的主要通路, 是电解质转运和液体分泌的关键通道^[56]。CFTR 主要表达在黏膜下腺的浆液细胞顶膜面, 由 1 480 个氨基酸组成, 共形成 5 个区域, 包括 2 个跨膜区, 其中各区由 6 个跨膜段组成^[57]。CFTR 能够被 cAMP 依赖的 PKA 的共价修饰, 使得功能活化, 具有分泌 Cl⁻的功能和对上皮钠离子通道 (ENaC, epithelial sodium channel) 活性的调控功能。同时, CFTR 508 位丝氨酸的磷酸化程度能够调控其活性, 决定分泌效率。PKA 能够将 CFTR 中 508 位的丝氨酸磷酸化, 进而调控 CFTR 活性。胞内 cAMP 浓度增加可以激活 PKA, 而 cAMP 浓度降低后 CFTR 随即失活, 因此胞内 cAMP 浓度是调控 CFTR 功能的重要靶点。腺苷酸环化酶 (AC, adenylate cyclase) 能够增加 cAMP 合成, 提高其浓度; 磷酸二酯酶 (PDE, phosphodiesterase) 能够降解胞内 cAMP, 降低其浓度。因此药物能够调节 AC 或是 PDE 的活性就能调控 CFTR 功能, 影响呼吸道浆液分泌。此外, 在一些种属中, cAMP 浓度的增加可以促进含有 CFTR 的囊泡与细胞膜结合, 提高膜蛋白表达, 增加通道密度, 增大分泌量。合成的 CFTR 与其他膜蛋白类似, 能够由内质网通过囊泡分泌结合到细胞顶膜面, 又能够在某些刺激时由顶膜面脱落结合至内质网, 或经溶酶体降解。因此对于 CFTR, 从 cAMP 浓度依赖的功能上, 还是从蛋白表达结合上, 都能多角度调节上皮细胞顶膜面 Cl⁻分泌, 影响浆液分泌。

6 脂多糖及 PM_{2.5} 对呼吸道浆液分泌的影响

呼吸道浆液分泌异常是临床呼吸系统发病率增加、病程加剧的主要诱因。其分泌功能异常会导致痰液分泌增加, 产生咽炎、肺炎及肺癌等疾病。当浆液分泌减少时, 纤毛运动受阻, 黏液无

法排出, 痰液分泌增加积累在气道, 其中黏附的细菌微生物不断增殖, 引起组织炎症, 加重呼吸道疾病症状, 进而引起肺炎等疾病, 长期发展容易造成肺癌, 危及人体健康。同时诱发的各种炎症因子、污染物粉尘颗粒、细菌病毒等又会刺激上皮细胞, 降低某些离子转运体功能, 抑制转录表达, 或是增加受体敏感性, 进一步抑制浆液分泌, 从多角度损伤呼吸系统生理功能。研究表明多种外界刺激^[58-59]可抑制呼吸道上皮细胞 CFTR 与 AQP_s 表达, 不仅能够抑制 mRNA 转录, 降低蛋白翻译, 还能诱导已结合的 CFTR 从质膜上脱落, 减少膜蛋白结合数量, 从而减弱细胞渗透性, 降低浆液分泌体积, 影响呼吸系统正常生理功能。在 CFTR mRNA 表达过程中, 调控受多种因素影响, 如 miR-138 (一种 microRNA) 的丰度^[60], NF-κB 的激活^[61], 经 JAK/STAT 通路而激活的 JAK2^[62] 以及血管升压素 (vasopressin) 的活性^[63] 等。Akt 是 CFTR 合成中信号转导的关键介质^[64-65], 脂多糖 (LPS, lipopolysaccharide) 可以结合 Toll 样受体 4 (TLR4, Toll-like receptor 4) 并磷酸化 Akt 来激活 phosphoinositide3-kinase (PI3K)-Akt 通路, 从而导致 CFTR 表达下调^[66-67]。针对于此, LY294002 (a PI3K/Akt 抑制剂) 可以消除这种影响^[67]。此外, CFTR 表达异常被认为是一种广泛存在于白种人中的遗传性疾病——囊性纤维化疾病 (CF, cystic fibrosis) 的主要原因^[68]。虽然顶膜面的 CaCC 能够一定程度地补偿 CFTR 缺失造成的损伤, 在 CF 疾病中 CaCC 活性上调, 能够弥补 CFTR 介导的 Cl⁻分泌, 但是这种轻度外线整流 Cl⁻通道与 CFTR 相比作用仍显得很弱。因此对于 CFTR 来说, 功能或是表达的损伤对呼吸道浆液分泌都会产生严重影响。

6.1 脂多糖的影响

脂多糖 (LPS, lipopolysaccharide) 是存在于革兰氏阴性细菌细胞壁中的有毒物质。在呼吸系统中, LPS 能够诱导炎症介质分泌并激活炎症通路, 产生组织炎症^[69]; 同时活化 MAPKs 信号通路, 诱导黏蛋白分泌增加, 引起痰液黏稠, 影响痰液排出^[70]。此外, LPS 还可以结合 TLR4 并通过磷酸化 Akt 激活 phosphoinositide3-kinase (PI3K)-Akt 通路, 从而导致 CFTR 表达下调^[66-67], 使得呼吸道浆液分泌减少, 纤毛摆动受阻, 加重组织炎症反应。可以看出, LPS 不仅能够增加黏蛋白分泌, 还能减少 CFTR 表达, 从黏液分泌和浆液分泌两个角度影响

呼吸道分泌功能,产生痰液增多及炎症等病症。

6.2 PM_{2.5}的影响

细颗粒物(PM_{2.5})是评价大气污染的重要标志,它与呼吸系统疾病的发病率及死亡率密切相关^[71-74]。通过评估PM_{2.5}暴露所引起的相对风险,发现PM_{2.5}更容易引起成人局部缺血性心脏病、慢性阻塞性肺病、肺癌及中风;而对于5岁以下的儿童而言,急性下呼吸道感染的风险则会更高^[74-76]。Global Burden of Disease的研究认为,仅在2010年全球就有超过300万人因PM_{2.5}所引起的各种疾病而过早死亡^[77]。在中国,PM_{2.5}每年会引起120万人死亡,PM_{2.5}污染是造成死亡的第四大危险因素,超过55岁后慢性呼吸系统疾病致死率会随着年龄的增长而越来越高^[78]。呼吸系统疾病的发病率随着PM_{2.5}污染的加重而逐年增加,故研究抗PM_{2.5}所致肺损伤的治疗药物及其作用机制,很有必要。

PM_{2.5}粒径微小,能够通过损伤呼吸道黏膜上皮细胞,沉积在肺泡内或肺间质内,激活肺内的免疫细胞,引起气道炎性反应、氧化损伤、肺泡上皮细胞DNA损伤、周期阻滞及细胞凋亡,最终造成肺损伤^[79-88]。近期研究表明:①PM_{2.5}通过影响TRPA1和TRPV1表达,上调小鼠OVA敏感性,增加气道阻力和肺顺应性,恶化哮喘发病症状^[89];②PM_{2.5}能够上调黏蛋白MUC4与MUC5AC表达,增加浆液分泌黏性^[90-91];③PM_{2.5}能够通过激活TLR4/MyD88通路及NLRP3炎症小体诱导IL-1 β 分泌,并在升高肺组织巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸细胞活化趋化因子、IL-5水平的同时,增加小鼠肺灌洗液及血液中IL-6和TNF α 水平,引起呼吸系统及全身炎症反应^[92-94];④PM_{2.5}能够在升高肺组织LDH及ROS的同时降低肺上皮细胞CAT与SOD活性,并引起细胞自噬,产生组织氧化损伤^[95-96]。可以看出,PM_{2.5}对肺的损伤是多方面的,既影响肺功能,又影响呼吸道浆液及黏液分泌,还会引起组织炎症及氧化损伤。

7 柚皮苷的药理研究进展

7.1 柚皮苷的镇咳、祛痰、消炎作用

7.1.1 镇咳作用方面 柚皮苷的镇咳机制与KATP开放、C纤维和P物质释放无关,而是通过抑制RARs放电进而产生外周性镇咳;柚皮苷能够显著抑制烟熏所致豚鼠慢性病理性咳嗽及OVA介导的豚鼠CVA疾病^[97-99]。

7.1.2 祛痰作用方面 柚皮苷对痰液中的黏液成

分与浆液成分均具有调节作用。一方面,能显著抑制LPS和EGF诱导的气道黏蛋白的合成、分泌以及气道上皮杯状细胞的增生;另一方面,它能够通过活化气道上皮细胞基顶膜CFTR的表达与功能,促进Cl⁻分泌到气道腔,进而通过渗透压活化AQPs促进气道内浆液分泌,同时上调LPS抑制的AQP1与AQP5表达^[100-102]。

7.1.3 消炎作用方面 柚皮苷对LPS诱导的急性肺部炎症、CS暴露诱导的慢性气道炎症均具有很好的抑制作用,不仅对LPS诱导的急性肺损伤小鼠急性气道炎症有显著抑制效果,还可以显著抑制烟熏诱导的COPD大鼠及豚鼠慢性气道炎症、黏液高分泌、咳嗽高反应性及气道高反应性等COPD典型症状,并且其对慢性气道炎症的抑制作用与气道中促炎症消退介质LXA4含量呈正相关;一方面,柚皮苷显著抑制BALF中促炎因子IL-8水平、减少中性粒细胞浸润,同时抑制抗炎因子IL-10的降低,促进ALX受体表达;另一方面,柚皮苷具有一定促进炎症消退的作用,可以通过调控NO释放和同型半胱氨酸代谢促进炎症消退,在此过程中Arg1、Bhmt、Gnmt等可能是药物抗炎的作用靶点^[98-99,103-108]。

7.2 柚皮苷主要代谢产物柚皮素对呼吸道张力收缩及浆液分泌的调控机制研究进展

7.2.1 在呼吸道张力收缩调控方面 柚皮苷在体内代谢为柚皮素,能激活大鼠结肠平滑肌BK_{Ca}通道,引起细胞膜超极化,减少Ca²⁺内流,从而对大鼠结肠平滑肌产生舒张效应^[109]。同样的,柚皮素能够剂量依赖地激活血管平滑肌细胞BK_{Ca}通道,产生舒张血管的作用,柚皮苷与其作用一致,但是舒张效果较弱^[110]。此外,柚皮素还能增加HEK293T细胞中BK_{Ca}通道活性^[111]。以上结果可以提示柚皮苷和柚皮素可能通过调控呼吸道平滑肌BK_{Ca}通道介导的超极化状态,调节呼吸道平滑肌收缩,产生舒张作用。然而目前没有针对呼吸道平滑肌研究柚皮苷对BK_{Ca}通道的调控作用,鉴于不同部位组织结构功能差异,此研究十分必要。

我们构建了CCh和KCl诱导的体外呼吸道张力收缩异常疾病病理模型,考察了柚皮素对呼吸道张力和平滑肌胞内Ca²⁺浓度的影响。柚皮素主要通过激活BK_{Ca}通道直接舒张呼吸道平滑肌,引起平滑肌细胞膜超极化,降低胞内Ca²⁺浓度,产生呼吸道舒张作用。这一研究结果科学阐释了柚皮素对呼吸道平滑肌张力变化的调控作用及机制,为

柚皮素在呼吸系统疾病 CVA 中的临床应用提供了实验数据与理论依据。

因柚皮素能够抑制 CVA 豚鼠咳嗽次数及气道高反应性,提示柚皮素对呼吸道平滑肌具有调控作用,能够降低呼吸道张力,舒张呼吸道平滑肌。我们从组织与细胞两个层面分别考察柚皮素对呼吸道平滑肌张力变化的影响。在考察对组织张力收缩的调控作用时,使用 CCh 诱导呼吸道张力收缩模型,通过去除上皮,使用离子通道抑制剂等方法,筛选了柚皮素对呼吸道平滑肌的作用通路;在考察对胞内 Ca^{2+} 浓度的调控作用时,分别使用 CCh 及高浓度 KCl 诱导胞内 Ca^{2+} 浓度升高模型,通过离子通道抑制剂对组织舒张实验结果进行验证,从细胞层面揭示药物舒张作用机制。

在采用 CCh 诱导呼吸道张力收缩模型研究柚皮素对组织张力收缩的调控作用时,使用肌张力测定系统检测急性分离的呼吸道组织张力变化。研究表明:柚皮素能够剂量依赖性地降低 CCh 诱导的呼吸道张力增加,恢复组织舒张状态;柚皮素引起的呼吸道舒张作用不受上皮调控,直接作用于呼吸道平滑肌,是一种非上皮依赖的舒张效应;柚皮素产生的舒张作用主要由 BK_{Ca} 通道介导,通过激活 BK_{Ca} 通道引起平滑肌细胞膜超极化,产生舒张效应。

在采用 CCh 及高浓度 KCl 诱导胞内 Ca^{2+} 浓度升高模型研究柚皮素对胞内 Ca^{2+} 浓度的调控作用时,使用实时定量 Ca^{2+} 成像系统检测原代培养呼吸道平滑肌细胞胞内 Ca^{2+} 浓度变化。研究表明:柚皮素能够降低 CCh 及高浓度 KCl 诱导的胞内 Ca^{2+} 浓度升高,恢复胞内 Ca^{2+} 浓度水平;柚皮素产生的 Ca^{2+} 浓度调控作用受 BK_{Ca} 通道影响;柚皮素主要通过激活 BK_{Ca} 通道开放,引起 K^{+} 外流,胞内降低的 K^{+} 浓度引起呼吸道平滑肌细胞超极化,阻碍电压门控 Ca^{2+} 通道,激活钠钙交换体运作,促进 Ca^{2+} 浓度降低,抑制气道平滑肌收缩,进而促进呼吸道平滑肌舒张,降低气道组织张力。

以上研究结果系统解释了柚皮苷调节呼吸道平滑肌张力的作用与机制,为其在临床 CVA 疾病治疗中的应用提供了实验数据与理论依据。

7.2.2 在呼吸道浆液分泌调控方面 柚皮苷能显著抑制 LPS 和 EGF 诱导的气道黏蛋白的合成与分泌以及气道上皮杯状细胞的增生,调控痰液黏稠度。然而柚皮苷对呼吸道浆液分泌的调控作用还是一个空白,目前没有研究从 CFTR 功能、表达,

以及 AQP 表达的角度分析柚皮苷祛痰的药理活性,我们考察了柚皮苷/柚皮素对上皮浆液分泌的调控作用,为揭示柚皮苷祛痰的药理活性及其临床研究与应用提供理论依据。

我们构建了 LPS 与 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导的体内、外呼吸道浆液分泌异常疾病病理模型,考察了柚皮素对呼吸道浆液分泌离子转运和通道表达的影响。结果表明柚皮素能够通过增加胞内 cAMP 浓度,激活 CFTR 通道,引起 Cl^{-} 定向转运,促进水分转运浆液分泌,恢复 LPS 和 $\text{PM}_{2.5}$ 损伤的呼吸道 CFTR、AQP1、AQP5 表达,降低溶菌酶及蛋白质浓度,改善浆液黏稠度,同时调节 LPS 与 $\text{PM}_{2.5}$ 所致的浆液分泌异常。这一研究结果科学阐释了柚皮苷对呼吸道上皮浆液分泌的调控作用及机制,为其在呼吸系统疾病中的应用提供了依据。

祛痰作用包括对黏液分泌调控和浆液分泌调控两个方面,本团队前期已证实柚皮苷能显著抑制 LPS 和 EGF 诱导的气道黏蛋白的合成与分泌以及气道上皮杯状细胞的增生,但柚皮苷对浆液分泌的调控机制还是一个空白点。我们从动物、组织与细胞 3 个层面分别考察柚皮苷/柚皮素对呼吸道浆液分泌的影响。在考察对呼吸道上皮 Cl^{-} 转运的调控作用时,采用急性分离大鼠呼吸道组织,通过短路电流技术,使用离子通道抑制剂等方法,筛选了药物对呼吸道上皮 Cl^{-} 转运的作用通路,验证了药物调控机制;在考察药物对 LPS 与 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导的体内、外呼吸系统疾病的影响时,分别使用 LPS 与 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导浆液分泌异常模型,通过气液分界培养,分泌浆液检查等分子生物学检测技术,研究了药物对 LPS 与 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导浆液分泌异常的调控作用。

在采用急性分离的大鼠呼吸道组织研究柚皮素对呼吸道离子转运的调控作用时,使用短路电流及 Elisa 技术检测呼吸道组织 Cl^{-} 转运及 cAMP 浓度变化。研究表明:柚皮素能够增加呼吸道上皮细胞胞内 cAMP 浓度,激活顶膜面 CFTR 通道,引起 Cl^{-} 分泌,基底膜面 NKCC 和 K^{+} 通道参与调控此过程;通过基底膜面 NKCC 吸收及顶膜面 CFTR 分泌定向转运 Cl^{-} ,柚皮素能够增加 Cl^{-} 跨上皮分泌,促进水分转运浆液分泌。

在采用 LPS 及 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导呼吸道上皮细胞浆液分泌异常模型研究柚皮素对离子浆液转运分泌功能及通道表达的影响时,使用气液分界培养、qRT-PCR 及 Elisa 技术,检测呼吸道上皮细胞浆液

分泌 Na^+ 、 Cl^- 、溶菌酶、蛋白质浓度,胞内cAMP浓度以及CFTR、AQP1与AQP5基因表达的变化。研究表明:LPS及 $\text{PM}_{2.5}$ 可诱导呼吸道上皮细胞浆液分泌异常;柚皮素增加呼吸道浆液分泌,在激活CFTR功能的同时降低LPS及 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导的溶菌酶及蛋白质高分泌,增加 Na^+ 、 Cl^- 分泌,且升高细胞受LPS及 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导所致的CFTR、AQP1与AQP5 mRNA及蛋白低表达;柚皮素具有改善LPS及 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导的呼吸道上皮细胞浆液分泌异常的作用。

在采用 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导BALB/c小鼠肺水肿模型研究柚皮苷对 $\text{PM}_{2.5}$ 致小鼠呼吸道浆液分泌异常的影

响时,使用小鼠肺组织滴注、组织干重测定、qRT-PCR及Elisa技术,检测肺组织干重比、黏蛋白与总蛋白分泌量以及肺组织CFTR、AQP1与AQP5基因表达的变化。研究表明: $\text{PM}_{2.5}$ 能够诱导小鼠肺损伤,产生肺水肿;柚皮苷能够减弱 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导的小鼠肺水肿,降低总蛋白分泌,改善浆液黏度。

总之,上述研究填补了国内外柚皮苷相关作用机制的研究空白,为临床应用提供了理论和实验依据,为创新药物的研发提供了思路。

参考文献:

- [1] JAMES A, CARROLL N. Airway smooth muscle in health and disease; methods of measurement and relation to function [J]. *European Respiratory Journal*, 2000, 15: 782-789.
- [2] JANSSEN L J. Ionic mechanisms and Ca^{2+} regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma? [J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2002, 282: L1161-L1178.
- [3] SANDERSON M J, DELMOTTE P, BAI Y, et al. Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca^{2+} signaling and sensitivity [J]. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2008, 5: 23-31.
- [4] WEBB R C. Smooth muscle contraction and relaxation [J]. *APS Refresher Course Report*, 2003, 27(4): 201-206.
- [5] FOLKERTS G, NIJKAMP F P. Airway epithelium: more than just a barrier [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1998, 8: 334-341.
- [6] INSUELA D B R, DALEPRANE J B, COELHO L P, et al. Glucagon induces airway smooth muscle relaxation by nitric oxide and prostaglandin E_2 [J]. *Journal of Endocrinology*, 2015, 225: 205-217.
- [7] SEMENOV I, WANG B, HERLIHY J T, et al. BK channel beta1-subunit regulation of calcium handling and constriction in tracheal smooth muscle [J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2006, 291: L802-L810.
- [8] SAVOIA C P, LIU Q H, ZHENG Y M, et al. Calcineurin upregulates local Ca^{2+} signaling through ryanodine receptor-1 in airway smooth muscle cells [J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2014, 307: L781-L790.
- [9] ROTHBERG B S. The BK channel: a vital link between cellular calcium and electrical signaling [J]. *Protein & Cell*, 2012, 3: 883-892.
- [10] TINKER A, AZIZ Q, THOMAS A. The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2014, 171: 12-23.
- [11] CLARK R, PROKS P. ATP-sensitive potassium channels in health and disease [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010, 654: 165-192.
- [12] SHEND K Z, LAGRUTTA A, DAVIES N W, et al. Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus oocytes*: Evidence for tetrameric channel formation [J]. *European Journal of Physiology*, 1994, 426(5): 440-445.
- [13] WALLNER M, MEERA P, TORO L. Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca^{2+} -sensitive K^+ channels: An additional transmembrane region at the N terminus [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(25): 14922-14927.
- [14] MEERA P, WALLNER M, SONG M, et al. Large conductance voltage- and calcium-dependent K^+ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), and extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(25): 14066-14071.
- [15] MORROW J P, ZAKHAROV S I, LIU G, et al. Defining the BK channel domains required for beta 1-subunit modulation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(13): 5096-5101.
- [16] LIU G, ZAKHAROV S I, YANG L, et al. Locations of the beta 1 transmembrane helices in the BK potassium channel [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(31): 10727-10732.
- [17] KOVAL O M, FAN Y, ROTHBERG B S. A role for the S0 transmembrane segment in voltage-dependent gating of BK channels [J]. *Journal of General Physiology*, 2007, 129(3): 209-220.
- [18] PANTAZI A, KOHANTEB A P, OLCESE R. Relative motion of transmembrane segments S0 and S4 during voltage sensor activation in the human BK_{Ca} channel [J]. *Journal of General Physiology*, 2010, 136(6): 645-657.
- [19] WEBB T I, KSHATRI A S, LARGE R J, et al. Molecular mechanisms underlying the effect of the novel BK channel opener GoSlo: Involvement of the S4/S5 linker and the S6 segment [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(7): 2064-2069.
- [20] ZHANG G, YANG H, LIANG H, et al. A charged residue in

- S4 regulates coupling among the activation gate, voltage, and Ca^{2+} sensors in BK channels [J]. *Journal of Neuroscience*, 2014, 34(37): 12280–12288.
- [21] ZHOU Y, XIA X, LINGLE C J. Cadmium–cysteine coordination in the BK inner pore region and its structural and functional implications [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(16): 5237–5242.
- [22] SCHREIBER M, SALKOFF L. A novel calcium–sensing domain in the BK channel [J]. *Biophysical Journal*, 1997, 73(3): 1355–1363.
- [23] SCHREIBER M, YUAN A, SALKOFF L. Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels [J]. *Nature Neuroscience*, 1999, 2(5): 416–421.
- [24] JIANG Y, PICO A, CADENE M, et al. Structure of the RCK domain from the *E. coli* K^+ channel and demonstration of its presence in the human BK channel [J]. *Neuron*, 2001, 29(3): 593–601.
- [25] BAO L, RAPIN A M, HOLMSTRAND E C, et al. Elimination of the BK_{Ca} channel's high–affinity Ca^{2+} sensitivity [J]. *Journal of General Physiology*, 2002, 120(2): 173–189.
- [26] NIMIGEAN C M, MAGLEBY K L. The beta subunit increases the Ca^{2+} sensitivity of large conductance Ca^{2+} –activated potassium channels by retaining the gating in the bursting states [J]. *Journal of General Physiology*, 1999, 113(3): 425–439.
- [27] BRENNER R, PERÉZ G J, BONEV A D, et al. Vaso–regulation by the beta 1 subunit of the calcium– activated potassium channel [J]. *Nature*, 2000, 407(6806): 870–876.
- [28] COX D H, ALDRICH R W. Role of the beta 1 subunit in large–conductance Ca^{2+} –activated K^+ channel gating energetics–mechanisms of enhanced Ca^{2+} sensitivity [J]. *Journal of General Physiology*, 2000, 116(3): 411–432.
- [29] NIMIGEAN C M, MAGLEBY K L. Functional coupling of the $\beta 1$ subunit to the large conductance Ca^{2+} –activated K^+ channel in the absence of Ca^{2+} [J]. *Journal of General Physiology*, 2000, 115(6): 719–734.
- [30] PATTERSON A J, HENRIE–OLSON J, BRENNER R. Vasoregulation at the molecular level: A role for the beta 1 subunit of the calcium–activated potassium (BK) channel [J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2002, 12: 78–82.
- [31] ZHU Y, BIAN Z, LU P, et al. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta [J]. *Science*, 2002, 295(5554): 505–508.
- [32] BAO L, COX D H. Gating and ionic currents reveal how the BK_{Ca} channel's Ca^{2+} sensitivity is enhanced by its beta 1 subunit [J]. *Journal of General Physiology*, 2005, 126(4): 393–412.
- [33] MOCZYDLOWSKI E, LATORRE R. Gating kinetics of Ca^{2+} –activated K^+ channels from rat muscle incorporated into planar lipid bilayers. Evidence for two voltage–dependent Ca^{2+} binding reactions [J]. *The Journal of General Physiology*, 1983, 82(4): 511–542.
- [34] ROTHBERG B S, MAGLEBY K L. Voltage and Ca^{2+} activation of single large–conductance Ca^{2+} –activated K^+ channels described by a two–tiered allosteric gating mechanism [J]. *Journal of General Physiology*, 2000, 116(1): 75–99.
- [35] HERRIGAN F T, ALDRICH R W. Coupling between voltage sensor activation, Ca^{2+} binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels [J]. *Journal of General Physiology*, 2002, 120(4): 267–305.
- [36] MEREDITH A L, THORNELOE K S, WERNER M E, et al. Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca^{2+} –activated K^+ channel [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(35): 36746–36752.
- [37] BRENNER R, CHEN Q H, VILAYTHONG A, et al. BK channel beta 4 subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures [J]. *Nature Neuroscience*, 2005, 8(12): 1752–1759.
- [38] WERNER M E, ZVARA P, MEREDITH A L, et al. Erectile dysfunction in mice lacking the large–conductance calcium–activated potassium (BK) channel [J]. *Journal of Physiology–London*, 2005, 567(2): 545–556.
- [39] IMLACH W L, FINCH S C, DUNLOP J, et al. The molecular mechanism of "Ryegrass Stagers" a neurological disorder of K^+ channels [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2008, 327(3): 657–664.
- [40] SEIBOLD M A, WANG B, ENG C, et al. An African–specific functional polymorphism in *KCNMB1* shows sex–specific association with asthma severity [J]. *Human Molecular Genetics*, 2008, 17(17): 2681–2690.
- [41] WANG B, ROTHBERG B S, BRENNER R. Mechanism of increased BK channel activation from a channel mutation that causes epilepsy [J]. *Journal of General Physiology*, 2009, 133(3): 283–294.
- [42] SEMENOV I, WANG B, HERLIHY J T, et al. BK channel beta1 subunits regulate airway contraction secondary to M2 muscarinic acetylcholine receptor mediated depolarization [J]. *Journal of Physiology–London*, 2011, 589(7): 1803–1817.
- [43] TURCOTTE S E, LOUGHEED M D. Cough in asthma [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11: 231–237.
- [44] MINOGUCHI K, ODA N, ADACHI M. T helper 2 lymphocyte responses and airway inflammation in atopic patients with cough variant asthma and classic asthma [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 124: 318–320.
- [45] de DIEGO A, MARTINEZ E, PERPINA M, et al. Airway inflammation and cough sensitivity in cough–variant asthma [J]. *Allergy*, 2005, 60: 1407–1411.
- [46] NIIMI A. Cough and Asthma [J]. *Curr Respir Med Rev*, 2011, 1: 47–54.
- [47] NIIMI A. Cough Variant Asthma [J]. *Clinical Pulmonary Medicine*, 2008, 15: 189–196.
- [48] MAGNI C, CHELLINI E, ZANASI A. Cough variant asthma and atopic cough [J]. *Multidiscip Respir Med*, 2010, 5: 99–103.
- [49] BRIGHTLING C E. Cough due to asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis [J]. *Lung*, 2010, 188: 13–17.
- [50] ANTONIU S A, MIHAESCU T, DONNER C F. Pharmacotherapy of cough–variant asthma [J]. *Expert Opin Pharmacol*, 2007, 8: 3021–3028.
- [51] ABOUZGHEIB W, PRATTER M R, BARTTER T. Cough and asthma [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2007, 13: 44–48.
- [52] BENOIT C, RENAUDON B, SALVAIL D, et al. EETs relax

- airway smooth muscle via an EpDHF effect: BK(Ca) channel activation and hyperpolarization [J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2001, 280: L965-L973.
- [53] KOTLIKOFF M I, KAMM K E. Molecular mechanisms of beta-adrenergic relaxation of airway smooth muscle [J]. *Annu Rev Physiol*, 1996, 58: 115-141.
- [54] DERICHS N, JIN B J, SONG Y, et al. Hyperviscous airway periciliary and mucous liquid layers in cystic fibrosis measured by confocal fluorescence photobleaching[J]. *FASEB J*, 2011, 25: 2325-2332.
- [55] MORAN O, ZEGARRA-MORAN O. On the measurement of the functional properties of the CFTR[J]. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2008, 7(6): 483-494.
- [56] ROWE S M, MILLER S, SORSCHER E J. Cystic fibrosis [J]. *New Engl J Med*, 2005, 352:1992-2001.
- [57] SHEPPARD D N, WELSH M J. Structure and function of the CFTR chloride channel[J]. *Physiological Reviews*, 1999, 79 (1 Suppl): S23-S45.
- [58] SKOWRON-ZWARG M, BOLAND S, CARUSO N, et al. Interleukin-13 interferes with CFTR and AQP5 expression and localization during human airway epithelial cell differentiation [J]. *Experimental Cell Research*, 2007, 313 (12) : 2695-2702.
- [59] THIAGARAJAH J R, VERKMAN A S. CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2003, 3(6): 594-599.
- [60] RAMACHANDRAN S, KARP P H, JIANG P, et al. A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and $\Delta F508$ mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 13362-13367.
- [61] BROUILLARD F, BOUTHIER M, LECLERC T, et al. NF κ B mediates up-regulation of CFTR gene expression in calu-3 cells by interleukin-1 β [J]. *Biol Chem*, 2001, 276: 9486-9491.
- [62] KULKA M, DERY R, NAHIRNEY D, et al. Differential regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by interferon γ in mast cells and epithelial cells[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 315: 563-570.
- [63] de LEMOS BARBOSA C M, SOUZA-MENEZES J, AMARAL A G, et al. Regulation of CFTR expression and arginine vasopressin activity are dependent on polycystin-1 in kidney-derived Cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38: 28-39.
- [64] ROUX J, CARLES M, KOH H, et al. Transforming growth factor 1 inhibits cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent cAMP-stimulated alveolar epithelial fluid transport via a phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent mechanism[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 4278-4290.
- [65] HSIEH A C, TRUITT M L, RUGGERO D. Oncogenic AKT inhibition of translation as a therapeutic target[J]. *Br J Cancer*, 2011, 105: 329-336.
- [66] HE Z, GAO Y, DENG Y, et al. Lipopolysaccharide induces lung fibroblast proliferation through Toll-like receptor 4 signaling and the phosphoinositide3-kinase-Akt pathway [J]. *PLoS One*, 2012;7:e35926.
- [67] YANG Y, CHENG Y, LIAN Q Q, et al. Contribution of CFTR to alveolar fluid clearance by lipoxin A4 via PI3K/Akt pathway in LPS-induced acute lung injury [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 862628.
- [68] RAMSEY B W, DAVIES J, McELVANEY N G, et al. A CFTR potentiator in patients with *Cystic fibrosis* and the G551D mutation [J]. *New Engl J Med*, 2011, 365: 1663-1672.
- [69] ZHAO Y, JOSHI-BARVE S, BARVE S, et al. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF- α expression by preventing NF- κ B activation [J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2004, 23(1): 71-78.
- [70] SHEN H, YOSHIDA H, YAN F, et al. Synergistic induction of MUC5AC mucin by nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 365 (4) : 795-800.
- [71] KAN H, LONDON S J, CHEN G, et al. Differentiating the effects of fine and coarse particles on daily mortality in Shanghai[J]. *Environ Int*, 2007, 33(3): 376-384.
- [72] WICHMANN H E. Diesel exhaust particles [J]. *Inhal Toxicol*, 2007, 19(Suppl. 1): 241-244.
- [73] LI P, XIN J, WANG Y, et al. The acute effects of fine particles on respiratory mortality and morbidity in Beijing, 2004-2009[J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2013, 20(9): 6433-6444.
- [74] VINIKOOR-IMLER L C, DAVIS J A, LUBEN T J. An ecologic analysis of county-level PM_{2.5} concentrations and lung cancer incidence and mortality [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2011, 8(6): 1865-1871.
- [75] BRUNEKREEF B, HOLGATE S T. Air pollution and health [J]. *Lancet*, 2002, 360, 1233-1242.
- [76] APTE J S, MARSHALL J D, COHEN A J, et al. Addressing global mortality from ambient PM_{2.5} [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(13): 8057-8066.
- [77] LIM S S, VOS T, FLAXMAN A D, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2224-2260.
- [78] YANG G, WANG Y, ZENG Y, et al. Rapid health transition in China, 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2013, 381(9882): 1987-2015.
- [79] RIVA D R, MAGALHÃES C B, LOPES A A, et al. Low dose of fine particulate matter (PM_{2.5}) can induce acute oxidative stress, inflammation and pulmonary impairment in healthy mice [J]. *Inhal Toxicol*, 2011, 23(5): 257-267.
- [80] UPADHYAY D, PANDURI V, GHIO A, et al. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29(2): 180-187.
- [81] WU J, SHI Y, ASWETO C O, et al. Fine particle matters induce DNA damage and G2/M cell cycle arrest in human bronchial epithelial BEAS-2B cells [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24(32): 25071-25081.
- [82] YANG J, HUO T, ZHANG X, et al. Oxidative stress and cell cycle arrest induced by short-term exposure to dustfall PM_{2.5} in A549 cells [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018,

- 25(23): 22408–22419.
- [83] LI N, HAO M, PHALEN R F, et al. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects [J]. *Clin Immunol*, 2003, 109(3): 250–265.
- [84] PALLESCHI S, ROSSI B, ARMIENTO G, et al. Toxicity of the readily leachable fraction of urban PM_{2.5} to human lung epithelial cells: Role of soluble metals [J]. *Chemosphere*, 2018, 196: 35–44.
- [85] COHEN R A, PETSONK E L, ROSE C, et al. Lung pathology in U. S. coal workers with rapidly progressive pneumoconiosis implicates silica and silicates [J]. *Am J Resp Crit Care Med*, 2016, 193(6): 673–680.
- [86] MAHDAVINIA M, KESHAVARZIAN A, TOBIN M C, et al. A comprehensive review of the nasal microbiome in chronic rhinosinusitis (CRS) [J]. *Clin Exp Allergy*, 2016, 46(1): 21–41.
- [87] AUTIO T J, TAPIAINEN T, KOSKENKORVA T, et al. The role of microbes in the pathogenesis of acute rhinosinusitis in young adults [J]. *Laryngoscope*, 2015, 125(1): 1–7.
- [88] BARI M R, HIRON M M, ZAMAN S M, et al. Microbes responsible for acute exacerbation of COPD [J]. *Mymensingh Medical Journal*, 2010, 19(4): 576–85.
- [89] LIU H, FAN X, WANG N, et al. Exacerbating effects of PM_{2.5} in OVA-sensitized and challenged mice and the expression of TRPA1 and TRPV1 proteins in lungs [J]. *J Asthma*, 2017, 54(8): 807–817.
- [90] PARK I H, KANG J H, KIM J A, et al. Diesel exhaust particles enhance MUC4 expression in NCI-H292 cells and nasal epithelial cells *via* the p38/CREB pathway [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2016, 3/4(171): 209–216.
- [91] HUANG L, PU J, HE F, et al. Positive feedback of the amphiregulin-EGFR-ERK pathway mediates PM_{2.5} from wood smoke-induced MUC5AC expression in epithelial cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11084.
- [92] WANG H, SONG L, JU W, et al. The acute airway inflammation induced by PM_{2.5} exposure and the treatment of essential oils in Balb/c mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44256.
- [93] ICHINOSE T, TAKANO H, SADAKANE K, et al. Mouse strain differences in eosinophilic airway inflammation caused by intratracheal instillation of mite allergen and diesel exhaust particles [J]. *J Appl Toxicol*, 2004, 24(1): 69–76.
- [94] ROBERTSON S, GRAY G A, DUFFIN R, et al. Diesel exhaust particulate induces pulmonary and systemic inflammation in rats without impairing endothelial function *ex vivo* or *in vivo* [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2012, 9: 9.
- [95] SKOVMAND A, DAMIAO G A C, KOPONEN I K, et al. Lung inflammation and genotoxicity in mice lungs after pulmonary exposure to candle light combustion particles [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 276: 31–38.
- [96] DENG X, ZHANG F, RUI W, et al. PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells [J]. *Toxicol in Vitro*, 2013, 27(6): 1762–1770.
- [97] GAO S, LI P B, YANG H L, et al. Antitussive effect of naringin on experimentally induced cough in Guinea pigs [J]. *Planta Med*, 2011, 77(1): 16–21.
- [98] LUO Y L, ZHANG C C, LI P B, et al. Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13(3): 301–307.
- [99] JIAO H Y, SU W W, LI P B, et al. Therapeutic effects of naringin in a guinea pig model of ovalbumin-induced cough-variant asthma [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2015, 33: 59–65.
- [100] NIE Y C, WU H, LI P B, et al. Naringin attenuates EGF-induced MUC5AC secretion in A549 cells by suppressing the cooperative activities of MAPKs-AP-1 and IKKs-IkappaB-NF-kappaB signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 690(1/2/3): 207–213.
- [101] LIN B Q, LI P B, WANG Y G, et al. The expectorant activity of naringenin [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2008, 21(2): 259–263.
- [102] 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.
- [103] LIU Y, SU W W, WANG S, et al. Naringin inhibits chemokine production in an LPS-induced RAW 264.7 macrophage cell line [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(6): 1343–1350.
- [104] LIU Y, WU H, NIE Y C, et al. Naringin attenuates acute lung injury in LPS-treated mice by inhibiting NF-κB pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(10): 1606–1612.
- [105] NIE Y C, WU H, LI P B, et al. Anti-inflammatory effects of naringin in chronic pulmonary neutrophilic inflammation in cigarette smoke-exposed rats [J]. *J Med Food*, 2012, 15(10): 894–900.
- [106] CHEN Y, NIE Y C, LUO Y L, et al. Protective effects of naringin against paraquat-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 58: 133–140.
- [107] CHEN Y, WU H, NIE Y C, et al. Mucoactive effects of naringin in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice and beagle dogs [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38(1): 279–287.
- [108] 李泮霖, 廖弈秋, 刘宏, 等. 采用 iTRAQ 技术研究柚皮苷对烟熏所致小鼠急性肺部炎症相关蛋白表达的影响 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2017, 56(4): 102–110.
- [109] YANG Z, PAN A, ZUO W, et al. Relaxant effect of flavonoid naringenin on contractile activity of rat colonic smooth muscle [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155: 1177–1183.
- [110] SAPONARA S, TESTAI L, IOZZI D, et al. (+/-)-Naringenin as large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK_{Ca}) channel opener in vascular smooth muscle cells [J]. *Brit J Pharmacol*, 2006, 149: 1013–1021.
- [111] HSU H T, TSENG Y T, LO Y C, et al. Ability of naringenin, a bioflavonoid, to activate M-type potassium current in motor neuron-like cells and to increase BK_{Ca}-channel activity in HEK293T cells transfected with α-hSlo subunit [J]. *BMC Neurosci*, 2014, 15: 135.