

论著·基础研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.25.008

晚期氧化蛋白产物调节人肾小管上皮细胞自噬的研究\*

章俊,向晓红,梁秀洁,束双双,姜婷婷,郭婷婷,汤 珣<sup>△</sup>  
(南方医科大学珠江医院肾内科,广州 510280)

**[摘要]** 目的 探讨晚期氧化蛋白产物(AOPPs)对人肾小管上皮细胞(HK-2)自噬的影响。方法 AOPPs刺激HK-2细胞,采用RT-qPCR和Western blot检测自噬相关蛋白LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、Beclin1和p62的表达;Western blot检测p38 MAPK通路的激活;加入p38 MAPK抑制剂(SB203580)与AOPPs共处理,观察自噬的改变,加入自噬诱导剂雷帕霉素与AOPPs共处理,并用RT-qPCR和Western blot检测细胞周期抑制蛋白p27的表达,用BCA法检测细胞总蛋白,观察细胞肥大的改变。结果 AOPPs下调LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、Beclin1,上调p62的表达,并激活p38 MAPK通路;与AOPPs单独处理组相比,SB203580与AOPPs共处理组LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ和Beclin升高而p62降低;雷帕霉素与AOPPs共处理组p27的表达和细胞总蛋白下调。结论 AOPPs通过激活p38 MAPK通路抑制HK-2细胞自噬,自噬抑制参与HK-2细胞肥大。  
**[关键词]** 自噬;p38 MAPK信号通路;晚期氧化蛋白产物  
**[中图分类号]** R692.5      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2017)25-3480-04

**Advanced oxidation protein products modulate autophagy of renal tubule epithelial cells\***  
*Zhang Jun, Xiang Xiaohong, Liang Xiujie, Shu Shuangshuang, Jiang Tingting, Guo Tingting, Tang Xun<sup>△</sup>*  
(Department of Nephrology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510280, China)  
**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of advanced oxidation protein products (AOPPs) on human renal tubular epithelial cells(HK-2) autophagy. **Methods** HK-2 cells were stimulated with AOPPs. RT-qPCR and Western blot were used to determine the expression of autophagy related protein LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ, Beclin1 and p62; Western blot was utilized to examine the activation of p38 MAPK pathway. Then p38 MAPK inhibitor (SB203580) was added and co-processed with AOPPs. The change of autophagy was observed. Also, autophagy inducer rapamycin was added and co-processed with AOPPs. RT-qPCR and Western blot were used to detect the expression of cell cycle inhibitory protein p27. The cell total protein level was detected by the bicinchoninic acid (BCA) method. The hypertrophy change was observed. **Results** AOPPs down-regulated the expression of LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ and Beclin1, up-regulated expression of p62 and activated p38 MAPK pathway; in comparison with the AOPPs alone treatment group, the expression of LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ and Beclin in the SB203580 co-processing group was increased, while p62 was decreased; the p27 expression and cells total protein in the sirolimus co-processing group were down-regulated. **Conclusion** AOPPs inhibits the autophagy of HK-2 cells by activating p38 MAPK pathway and the autophagy inhibition participates in HK-2 cell hypertrophy.  
**[Key words]** autophagy; p38 MAPK signaling pathway; advanced oxidation protein products

晚期氧化蛋白产物(AOPPs)是血清蛋白被自由基和反应性氧系统氧化后的产物,在糖尿病肾病(DN)患者血浆中明显增加,参与DN肾脏实质和间质的损害<sup>[1]</sup>。本课题组前期研究证明AOPPs导致人肾小管上皮细胞(HK-2)肥大<sup>[2]</sup>,然而其机制尚未完全明确。自噬是普遍存在于真核细胞中的一种依赖溶酶体的胞内降解系统,能清除细胞中受损或衰老的细胞器和大分子物质,维持细胞内环境稳定。自噬受到多种信号通路的精密调控,p38 MAPK属于其中的非哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)依赖途径<sup>[3]</sup>。前期研究表明,AOPPs可诱导HK-2细胞中p38 MAPK信号通路活化<sup>[4]</sup>。然而,AOPPs对HK-2细胞自噬有无影响,是否与p38 MAPK信号通路有关尚不明确。本实验通过研究AOPPs对HK-2细胞自噬的影响及其可能机制,以明确自噬在AOPPs导致HK-2细胞肥大中的作用。

**1 材料与方**

**1.1 材料** HK-2细胞株为条件永生性细胞系,购自美国ATCC细胞库;胎牛血清(FBS,美国Gibco);DMEM/F12细胞培养基(美国Hyclone);无毒素牛血清清蛋白(BSA,美国Sig-

ma);Trizol试剂、cDNA第一链合成试剂盒和SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>荧光定量PCR试剂盒(日本Takara);p27、p62、Beclin1及内参GAPDH引物由生物工程上海(股份)有限公司合成;p27、LC3B、Beclin1、p62、phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)、p38 MAPK兔抗人一抗及p38 MAPK信号通路特异性抑制剂SB203580,自噬诱导剂雷帕霉素(美国CST);GAPDH兔抗人一抗(美国Bioworld);HRP标记的羊抗兔二抗(北京Bioss);ECL检测试剂盒(美国Millipore)。

**1.2 方法**

**1.2.1 体外制备AOPPs** AOPPs的制备参见文献<sup>[4]</sup>。

**1.2.2 HK-2细胞的培养** 将HK-2细胞培养于含10%FBS和青霉素链霉素双抗的DMEM/F12培养基中,胰酶消化后接种,加药前换用无血清培养基同步过夜。加SB203580和雷帕霉素组先分别用10 μmol/L SB203580和100 nmol/L雷帕霉素预处理细胞1 h,再与AOPPs共同处理细胞24 h。

**1.2.3 实验分组** 为明确AOPPs对HK-2细胞自噬和p38 MAPK信号通路的影响,将细胞分为3组:(1)Ctrl组;(2)BSA

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81202842)。 作者简介:章俊(1966—),博士,主任医师,主要从事糖尿病肾病、晚期氧化蛋白产物的研究。 △ 通信作者,E-mail:1847672118@qq.com。

组:200  $\mu\text{g/mL}$  BSA;(3) AOPPs 组:200  $\mu\text{g/mL}$  AOPPs 作用 24 h。为明确 p38 MAPK 信号通路是否参与 AOPPs 对 HK-2 细胞自噬的调节,将细胞分为 3 组:(1)Ctrl 组;(2)AOPPs 组:200  $\mu\text{g/mL}$  AOPPs;(3) AOPPs + SB203580 组:10  $\mu\text{mol/L}$  SB203580 预处理 1 h 后,与 200  $\mu\text{g/mL}$  AOPPs 共同作用 24 h。为明确自噬在 AOPPs 导致 HK-2 细胞肥大中的作用,将细胞分为 3 组:(1)Ctrl 组;(2)AOPPs 组:200  $\mu\text{g/mL}$  AOPPs;(3)AOPPs + 雷帕霉素组:100 nmol/L 雷帕霉素预处理 1 h 后,与 200  $\mu\text{g/mL}$  AOPPs 共同作用 24 h。

**1.2.4 RT-qPCR** 按实验分组处理 HK-2 细胞后,用 Trizol 提取各样本细胞总 RNA,于核酸分析仪中检测 RNA 的浓度和纯度。参照试剂盒说明操作反转录合成 cDNA。采用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 荧光定量 PCR 试剂盒检测,管家基因 GAPDH 作为内参,引物序列见表 1,反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 30 s,扩增 40 个循环。上述实验重复 3 次,采用 2-DDCt 法进行统计学分析。

**1.2.5 单位细胞蛋白含量测定** 按实验分组处理 HK-2 细胞后,胰酶消化细胞取出微量细胞混悬液稀释后在细胞计数板下计数,RIPA 裂解液裂解细胞提取细胞总蛋白,梯度稀释 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  蛋白标准品,向 96 孔板中加入标准品或待测样品,加入 BCA 工作液 200  $\mu\text{L}$  (A 液:B 液为 50:1)。将酶标板振荡 30 s 后,37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min,用酶标仪测定 562 nm 波长处吸光度值。用 Excel 绘制标准曲线方程,要求  $r^2>0.995$ ,根据所测样品的吸光值和回归方程,计算出待测样品的蛋白浓度( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )和总蛋白含量,用总蛋白含量和总细胞数量的比值表示单位细胞总蛋白含量。

**1.2.6 Western blot** 按实验分组处理 HK-2 细胞后,用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,配平上样量和上样体积。取 20~50  $\mu\text{g}$  总蛋白行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,转膜至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,放入稀释的一抗中,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。一抗稀释比分别为 LC3B (1:500),Beclin1 (1:1 000),p62 (1:2 000),p27 (1:500),磷酸化-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (1:1 000),p38 MAPK (1:1 000),GAPDH (1:5 000)。回收一抗,TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次。二抗(稀释比 1:10 000)室温孵育 1 h 后 TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,ECL 显色。以 GAPDH 作为内参,用 Image J 软件进行条带定量。

表 1 基因引物序列及扩增产物大小

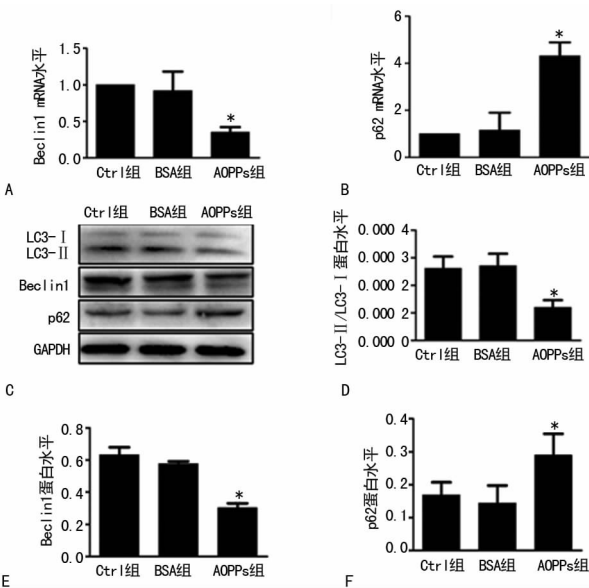
基因	引物	产物大小 (bp)
GAPDH	上游:5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'	307
	下游:5'-AGCCTTCTCTCATGGTGGTGAAGAC-3'	
p27	上游:5'-CACAGTGAGGGGAAGCCCTGAA-3'	240
	下游:5'-CAAGCCTCTTCCAGATCCTTAATGC-3'	
Beclin1	上游:5'-GTGGCTTTCTGGACTGTGT-3'	121
	下游:5'-CACTGCCTCCTGTGTCTTCA-3'	
p62	上游:5'-TAGGAACCCGCTACAAGTGC-3'	133
	下游:5'-GAGAAGCCCTCAGACAGGTG-3'	

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS20.0 统计学分析软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析。方差齐时,组间两两比较采用 LSD 法;方差不齐时,组间两两比较采用 Dunnett's *T* 法。以  $P<0.05$  为差异有统计学

意义。

### 2 结 果

**2.1 AOPPs 抑制 HK-2 自噬** 根据文献[5]报道和前期研究[2]结果,笔者将 200  $\mu\text{g/mL}$  未修饰的 BSA 或者 200  $\mu\text{g/mL}$  AOPPs 分别刺激 HK-2 细胞 24 h。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示,AOPPs 刺激使 HK-2 细胞 Beclin1 基因和蛋白表达降低而 p62 基因和蛋白的表达增高。此外,Western blot 结果显示,AOPPs 作用下,LC3- I 向 LC3- II 的转化减少(LC3- II/LC3- I), $P<0.05$ ,而未经修饰的 BSA 组与 Ctrl 组相比上述三者表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 1,提示 AOPPs 可能抑制 HK-2 自噬。

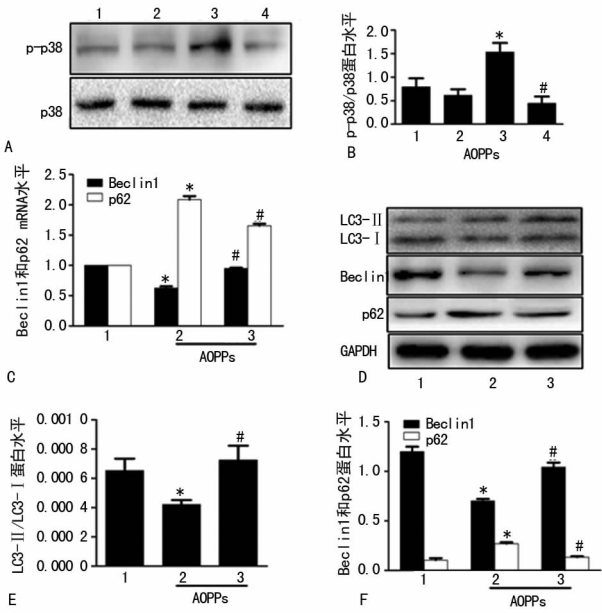


A: Beclin1 mRNA 表达分析图;B: p62 mRNA 表达分析图;C: LC3- II/LC3- I、Beclin1、p62 蛋白 Western blot 条带;D: LC3 II/LC3- I 蛋白表达分析图;E: Beclin1 蛋白表达分析图;F: p62 蛋白表达分析图;\* : $P<0.05$ ,与 Ctrl 组比较

图 1 AOPPs 抑制 HK-2 自噬

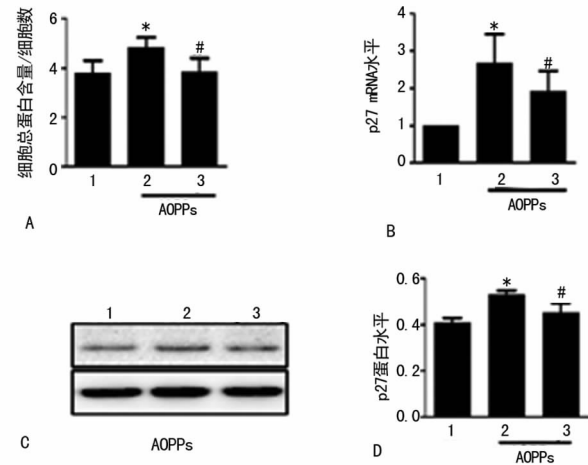
**2.2 P38 MAPK 信号通路介导 AOPPs 抑制 HK-2 自噬** 为进一步观察 AOPPs 抑制 HK-2 自噬是否与其激活 p38 MAPK 信号通路有关,本研究使用磷酸化 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 与 AOPPs 共同刺激 HK-2 细胞。与前期研究[4,6]一致,AOPPs 导致 p38 MAPK 磷酸化,而 10  $\mu\text{mol/L}$  SB203580 抑制该通路(图 2A、B, $P<0.05$ )。与 AOPPs 组相比,AOPPs + SB203580 组自噬相关基因和蛋白 Beclin1 和 p62 表达分别上调和下调,LC3- II/LC3- I 也增高(图 2C~F, $P<0.05$ ),说明磷酸化 p38 MAPK 特异性抑制剂可部分逆转 AOPPs 对 HK-2 细胞的自噬抑制作用,因而提示 p38 MAPK 信号通路介导了 AOPPs 抑制 HK-2 自噬。

**2.3 自噬抑制介导 AOPPs 导致 HK-2 肥大** 本课题组前期研究[2]证明 AOPPs 导致 HK-2 肥大。为明确 AOPPs 诱导细胞肥大的机制是否与自噬抑制有关,根据文献[7]报道,笔者使用 100 nmol/L 雷帕霉素增强 HK-2 细胞自噬,进一步观察了 AOPPs 诱导的肥大是否随之改善。本研究显示,与 AOPPs 组相比,AOPPs + 雷帕霉素组单位细胞蛋白含量减少,p27 基因和蛋白表达降低( $P<0.05$ ),见图 3,说明自噬增加后 HK-2 肥大减轻。提示自噬抑制可能为 AOPPs 导致 HK-2 肥大的机制之一。



A: p-p38/p38 蛋白 Western blot 条带; B: p-p38 蛋白表达; C: Beclin1、p62 mRNA 表达; D: LC3 II / I、Beclin1、p62 蛋白 Western blot 条带; E: LC3 II / I; F: Beclin1、p62 蛋白表达分析图灰度值与 p38 灰度值的比值柱形图; 1: Ctrl 组; 2: BSA 组; 3: AOPPs 组; 4: AOPPs + SB203580 组; \* :  $P < 0.05$ , 与 Ctrl 组比较; # :  $P < 0.05$ , 与 AOPPs 组比较

图 2 p38 MAPK 信号通路介导 AOPPs 抑制 HK-2 自噬



A: 细胞总蛋白含量/细胞数; B: p27 mRNA 表达; C: p27 蛋白 Western blot 条带; D: p27 蛋白表达; 1: Ctrl 组; 2: AOPPs 组; 3: AOPPs + 雷帕霉素组; \* :  $P < 0.05$ , 与 Ctrl 组比较; # :  $P < 0.05$ , 与 AOPPs 组比较

图 3 AOPPs 抑制自噬介导 HK-2 肥大

3 讨 论

本研究发现 AOPPs 抑制 HK-2 自噬,并提示自噬抑制受 p38 MAPK 信号通路调控,且自噬抑制参与了 AOPPs 导致的 HK-2 肥大。

HK-2 肥大是肾小管细胞遇到急性慢性应激反应时的早期表现,其主要表现为蛋白和 mRNA 水平的升高,细胞阻滞在  $G_1$  期<sup>[8]</sup>。细胞周期受周期蛋白的调控,p27 为周期抑制蛋白家族成员之一,在 HK-2 肥大时可观察到 p27 上调<sup>[9]</sup>。本研究发现 HK-2 肥大与自噬抑制有关。

自噬是一个动态的生物学过程,包括自噬起始,自噬体与

溶酶体融合及在溶酶体内的降解<sup>[10-11]</sup>。近年来大量的研究报道,自噬参与 DN、药物性肾损害、遗传性肾脏病、肾脏缺血再灌注等肾脏疾病的发生、发展。其中,在自噬参与 DN 进展的研究方面,Barbosa 等<sup>[12]</sup>早在 1992 年就已证明 DN 中 HK-2 自噬功能受损。Kitada 等<sup>[13]</sup>用高脂建立小鼠的 DN 模型,发现其 HK-2 内长寿蛋白 p62/SQSTM1 堆积,证实 2 型糖尿病导致的 DN 中, HK-2 的自噬受到抑制,而限制饮食后,观察到自噬增加, DN 症状得到改善。在研究不同刺激物对 HK-2 自噬的影响方面, Liu 等<sup>[14]</sup>的研究证明从微小病变肾病综合征患者中提取的尿蛋白体外刺激 HK-2,表现为自噬起始激活。而在 DN 患者体内明显升高的晚期糖基化终末产物 (AGEs) 则使 HK-2 自噬起始激活,而自噬在溶酶体降解阶段流量受阻,自噬被抑制<sup>[15]</sup>。而 Nolin 等<sup>[16]</sup>的研究表明,尿蛋白能抑制自噬体和溶酶体的融合,抑制自噬。本研究结果表明, AOPPs 使 HK-2 中 LC3-II/LC3-I、Beclin1 降低, p62 升高,提示在 AOPPs 的作用下,自噬可能在起始环节受到抑制。

自噬起始受到各种信号通路的精密调节,其中 p38 MAPK 对自噬起双重调节作用<sup>[17]</sup>。一方面, Paillas 等<sup>[18]</sup>的研究证明, p38 MAPK 磷酸化诱导自噬导致化疗药物耐药;另一方面, Cruz-Morillo 等<sup>[19]</sup>研究证明化疗药物 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 通过抑制 p38 MAPK 通路磷酸化激活自噬。最近的研究表明, AOPPs 激活 HK-2 p38 MAPK 信号通路<sup>[4]</sup>。于是本研究进一步观察了 AOPPs 抑制自噬是否与 p38 MAPK 信号通路有关。研究表明抑制 p38 通路,可以观察到自噬上调,表明 p38 MAPK 信号通路介导了 AOPPs 抑制 HK-2 自噬。

本实验发现 AOPPs 激活 p38 MAPK 信号通路抑制 HK-2 自噬,自噬抑制介导 AOPPs 导致的 HK-2 胞肥大,进一步阐明了 DN 的进展机制。然而仍有许多信号通路有效调控自噬活动,尚待进一步研究。

参考文献

[1] Kalousova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus[J]. Physio Res, 2002, 51(6): 597-604.

[2] Tang X, Rong G, Bu Y, et al. Advanced oxidation protein products induce hypertrophy and epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubular cells through induction of endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(2): 816-828.

[3] Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, et al. Molecular mechanism and regulation of autophagy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(12): 1421-1434.

[4] 黄丽丽, 祝小林, 邓伟谦, 等. p38 MAPK 信号通路介导晚期氧化蛋白产物诱导的肾小管上皮细胞间充质转化[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(9): 1209-1214.

[5] Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Jungers P, et al. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia[J]. Nephrol Dial Transplant, 1999, 14 Suppl 1: 76-78.

[6] Webber JL. Regulation of autophagy by p38 alpha MAPK[J]. Autophagy, 2010, 6(2): 292-293.

[7] Xu Y, Liu L, Xin W, et al. The renoprotective role of au-

tophagy activation in proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Complications, 2015, 29(8):976-983.

[8] Preisig PA, Franch HA. Renal epithelial cell hyperplasia and hypertrophy[J]. Semin Nephrol, 1995, 15(4):327-340.

[9] Shankland SJ, Wolf G. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 278(4):F515-F529.

[10] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(7):713-720.

[11] Wang ZB, Choi ME. Autophagy in kidney health and disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(3):519-537.

[12] Barbosa JA, Zhou H, Hultenschmidt D, et al. Inhibition of cellular autophagy in proximal tubular cells of the kidney in streptozotocin-diabetic and uninephrectomized rats[J]. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1992, 61(6):359-366.

[13] Kitada M, Takeda A, Nagai T, et al. Dietary restriction ameliorates diabetic nephropathy through Anti-Inflammatory effects and regulation of the autophagy via restoration of Sirt1 in diabetic wistar fatty (fa/fa) rats: a model of type 2 diabetes[J]. Exp Diabetes Res, 2011:908185.

[14] Liu WJ, Luo MN, Tan J, et al. Autophagy activation re-

duces renal tubular injury induced by urinary proteins [J]. Autophagy, 2014, 10(2):243-256.

[15] Liu WJ, Shen TT, Chen RH, et al. Autophagy-Lysosome pathway in renal tubular epithelial cells is disrupted by advanced glycation end products in diabetic nephropathy [J]. J Biol Chem, 2015, 290(33):20499-20510.

[16] Nolin AC, Mulhern RM, Panchenko MV, et al. Proteinuria causes dysfunctional autophagy in the proximal tubule [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 311(6):F1271-F1279.

[17] Sui XB, Kong N, Ye L, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents [J]. Cancer Lett, 2014, 344(2):174-179.

[18] Paillas S, Causse A, Marzi L, et al. MAPK14/p38 alpha confers irinotecan resistance to TP53-defective cells by inducing survival autophagy[J]. Autophagy, 2012, 8(7):1098-1112.

[19] Cruz-Morcillo LA, Valero ML, Callejas-Valera JL, et al. P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance[J]. Oncogene, 2012, 31(9):1073-1085.

(收稿日期:2016-12-15 修回日期:2017-06-09)

(上接第 3479 页)

肺肠合治法在对过敏性哮喘呼吸功能的恢复上优于单纯治肺法和单纯治肠法。这与国内其他学者利用肺肠合治法治疗过敏性哮喘的实验结果一致<sup>[14]</sup>。

综上所述,肺肠合治的治疗方法对于治疗肠道菌群失调合并过敏性哮喘大鼠在肺功能和肠道菌群恢复上都具有明显的优势和疗效,可作为治疗该病的首选治疗方案,为中医治疗肠道菌群失调合并过敏性哮喘提供了实验依据。治肠方在肠道菌群多样性的恢复上具有明显优势,而且治肺组对肠道致病菌梭状芽孢杆菌的抑制作用最优,因此可通过重新配伍的方法找到一个更优的肺肠合治方。

## 参考文献

[1] 刘子雯,申卫红. Th17 细胞在过敏性哮喘患者中的临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(7):995-997.

[2] 张琳. 肠道微生态环境与儿童过敏性疾病的关系以及参芪健脾方对肠黏膜屏障功能修复和免疫功能调整的研究[D]. 石家庄:河北中医药大学, 2011:2-3.

[3] 李春燕. 支气管哮喘患者肠道菌群多样性变化[J]. 科技导报, 2013, 30(30):63-67.

[4] 马红玲,王和平,祖莹,等. 双歧杆菌对过敏性哮喘儿童 DC 成熟及其分泌细胞因子的影响[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(8):1311-1315.

[5] 张芸,史锁芳. “肺与大肠相表里”学说的现代研究进展

[J]. 中医研究, 2015, 28(5):73-75.

[6] 廖伟平. 桂枝加厚朴杏子汤加减治疗变异型哮喘 35 例[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(3):17.

[7] 肖阳娥,黄晓川. 增液承气汤加减救治 40 例[J]. 新中医, 1997, 29(3):18-19.

[8] 王爱华. 增液承气汤治喘 1 例报道[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 11(10):139.

[9] 郭来,郭天然. 升降散临床应用新进展[J]. 中国中医急诊, 2011, 20(1):112-113.

[10] 鲁恒心. 升降散加减治疗咳嗽变异哮喘 38 例[J]. 中医中药, 2013, 11(20):290-290.

[11] 靳文学,白亚辉,杨宇. 加味升降散对过敏性哮喘豚鼠黏膜 sIgA 免疫影响的实验研究[J]. 中国中医急诊, 2007, 16(4):447-448.

[12] 黄汉超,陈宁,赵海方. 加味升降散对病毒感染后小鼠呼吸道上皮 VR1 表达及肺内 P 物质含量的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(1):15-17.

[13] 冯学武,朱宝,宋瑞平. 升降散加减治疗外感发热的体会[J]. 中国中医急诊, 2016, 25(1):182-183.

[14] 钟大玲,吴佳佳. 大承气汤对过敏性哮喘小鼠肺组织形态及 IgE 水平的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(7):58-60.

(收稿日期:2016-12-22 修回日期:2017-07-10)