

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2023.09.017

论著 · 基础

Cdc42 蛋白参与中性粒细胞弹性蛋白酶诱导的人气道上皮细胞黏蛋白高分泌

何明欣 周向东 杨雅楼 徐立 张华 李琪



基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81860001,82160012,82260001); 科技部重大专项(2022YFC2305004); 海南省重点研发项目(ZDYF2020223); 海南省自然科学基金项目(822MS071); 海南省重点研发计划国际科技合作项目(GHYF2022011); 海南省重大科技专项(ZDKJ202004,ZDKJ2021036,ZDKJ2021038); 海南省创新团队项目(820CXTD448); 国家卫生健康委员会热带病防治重点实验室开放课题(2021NHCTDCKFKT21008); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2019-12M-5-023); 海南医学院校级教学成果奖培育项目(HYjcp202202)

作者单位: 518036 深圳 北京大学深圳医院(何明欣、杨雅楼); 570102 海口 海南医学院第一附属医院呼吸内科(周向东、徐立、李琪); 571199 海口 海南医学院(何明欣、杨雅楼、张华)

通信作者: 张华 ,E-mail: zhanghuashelley@hotmail.com 李琪 ,E-mail: lqlq198210@sina.com

【摘要】 目的 探讨细胞分裂周期蛋白 42(Cdc42)与中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)诱导的气道上皮细胞黏蛋白(MUC)5AC 高分泌的关系。方法 体外培养人气道上皮细胞(16HBE),以 Cdc42 siRNA 和 NE 进行干预,将细胞分为 6 组:对照组、NE 组、NE + Cdc42 siRNA 组、Cdc42 siRNA 组、阴性 siRNA 组、NE + 阴性 siRNA 组。采用 Western blot 法检测 Cdc42 蛋白的相对含量,ELISA 和免疫荧光检测各组细胞 MUC5AC 蛋白的表达水平。结果 与对照组相比,NE 组 Cdc42 蛋白含量明显增加($P < 0.05$),细胞 MUC5AC 蛋白表达水平亦显著增高($P < 0.001$);与 NE 组比较,NE + Cdc42 siRNA 组的 MUC5AC 蛋白水平显著降低($P < 0.05$),其 Cdc42 蛋白含量亦明显降低($P < 0.001$);Cdc42 siRNA 组以及阴性 siRNA 组的 Cdc42 蛋白、MUC5AC 蛋白含量相较于对照组变化不大($P > 0.05$)。结论 Cdc42 在 NE 诱导的气道上皮细胞黏液高分泌的形成过程中可能发挥着重要的介导作用。

【关键词】 气道黏蛋白 5AC; 细胞分裂周期蛋白 42; 中性粒细胞弹性蛋白酶; 黏液高分泌

【中图分类号】 R332.2 **【文献标识码】** A

Cdc42 protein participates in neutrophil Elastase induced Mucoprotein hypersecretion in human airway epithelial cells He Mingxin, Zhou Xiangdong, Yang Yalou, Xu Li, Zhang Hua, Li Qi. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Hainan Province Haikou 570102, China

Correspondence author: Zhang Hua, E-mail: zhanghuashelley@hotmail.com; Li Qi, E-mail: lqlq198210@sina.com

Funding program: The National Natural Science Foundation of China (81860001,82160012,82260001); Major Special Projects of Ministry of Science and Technology (2022 YFC2305004); Key R&D Project of Hainan Province(ZDYF2020223); Hainan Natural Science Foundation Project (822MS071); International Science and Technology Cooperation Project of Key R&D Program of Hainan Province (GHYF 2022011); Major science and technology project of Hainan Province (ZDKJ202004, ZDKJ2021036, ZDKJ2021038); Hainan Innovation Team Project(820CXTD448); The National Health and Health Commission's Tropical Disease Control and Control Laboratory Opening Project (2021NHCTDCKFKT21008); Chinese Academy of Medical Sciences Medical and Health Science and Technology Innovation Project (2019-12M-5-023); Hainan Medical College Teaching Achievement Award Cultivation Project (HYjcp202202)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between cell division Cyclin 42 (Cdc42) and neutrophil Elastase (NE) induced hypersecretion of Mucoprotein (MUC) 5AC in airway epithelial cells. Methods Human airway epithelial cells (16HBE) were cultured in vitro and intervened with Cdc42 siRNA and NE. The cells were divided into six groups: control group, NE group, NE + Cdc42 siRNA group, Cdc42 siRNA group, negative siRNA group, and NE + negative siRNA group. Western blot method was used to detect the relative content of Cdc42 protein, and ELISA and immunofluorescence were used to detect the expression level of MUC5AC protein in each group of cells. Results Compared with the control group, the content of Cdc42 protein in the NE group was significantly

increased ($P < 0.05$), and the expression level of MUC5AC protein in cells was also significantly increased ($P < 0.001$); Compared with the NE group, the MUC5AC protein level in the NE + Cdc42 siRNA group was significantly reduced ($P < 0.05$), and the Cdc42 protein content was also significantly reduced ($P < 0.05$); The MUC5AC protein content in the Cdc42 siRNA group and the negative siRNA group showed little change compared to the control group ($P > 0.05$). Conclusion Cdc42 may play an important mediating role in the formation of NE induced mucus hypersecretion in airway epithelial cells.

【Key words】 Mucin5AC; Cell division cycle 42; Neutrophil elastase; Mucus hypersecretion

气道黏液高分泌是慢性气道炎性疾病的重要病理特征,长期的黏液高分泌易造成病原菌定植,进而引起持续性的感染和难以缓解的气道阻塞,从而严重影响患者的预后。气道黏蛋白(mucin, MUC) 5AC是气道黏液最具代表的病理性表达产物,在各种炎性介质、致病菌产物、蛋白酶及冷空气等始动因素刺激下易导致其过度表达^[1-2]。然而在众多促黏液因子中,目前已知中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)对病理性黏蛋白分泌的促进作用最强,极易促成黏液栓的形成^[3-4]。气道慢性炎性状态下,MUC5AC的合成储备量已较正常时明显增加,而当气道炎性反应急性发生时,胞浆中的黏蛋白储存量无法在短时间内进一步增多,因此,急性发作时出现气道黏液大量分泌的现象势必与胞内某种强有力的极性诱导因素导致黏蛋白出胞增多有关^[5-6]。已有研究表明,Rho作为一种小分子G蛋白,在蛋白囊泡出胞过程中起着至关重要的作用,其亚型细胞分裂周期蛋白(cell division cycle, Cdc) 42在细胞信号通路中具有分子开关的功能,参与细胞的黏附、迁移与极化,是蛋白出胞领域中研究最为广泛的小分子G蛋白之一^[7-8]。目前,Cdc42在癌细胞转移领域的研究较多,有关气道黏液高分泌的研究甚少,故本实验以NE作为黏液高分泌刺激因子构建体外细胞模型,采用siRNA干扰技术探究Cdc42与气道黏蛋白高分泌的关系及其可能的介导作用,报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 (1) 细胞、试剂:人支气管上皮细胞(16HBE) (ATCC, 美国)、DMEM培养液、HEPES、Trizol、胎牛血清(FBS)、HNE、抗GAPDH单克隆抗体(Sigma, 美国)、Cdc42 siRNA及阴性对照(Santa Cruz, 美国)、兔抗Cdc42蛋白抗体(博奥森, 北京)、小鼠抗MUC5AC单克隆抗体、HRP-羊抗兔抗体(Santa Cruz, 美国)、HRP-羊抗鼠抗体(Sigma, 美国) BAC蛋白浓度测定试剂盒(碧云天, 上海)、人MUC5AC ELISA试剂盒(凡科维)、Lipofectamine™ 2000试剂(Invitrogen, 中国)。(2) 仪器: SynergyHTX型多功能酶标仪(Bio-Tek, 美国)、LightCycler 480 II型荧光定量PCR仪

(Roche, 瑞士)、ABLX5全自动化学发光图像分析系统(Tanon, 中国)。

1.2 细胞培养及分组 将16HBE细胞培养于含10%的胎牛血清和双抗(100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素)的DMEM培养基中,置于37℃、5% CO₂培养箱内孵育,常规换液培养。当细胞贴壁达80%~90%时将其传代至6孔板内,细胞数量为(2~5) × 10⁵/孔,分为6组。(1) 对照组:无FBS和双抗的基础DMEM培养基培养细胞;(2) NE组:无FBS培养基中加入NE 25 nmol/L;(3) NE + Cdc42 siRNA组:细胞Cdc42 siRNA 5 μmol/L预处理30 min后加入25 nmol/L NE;(4) NE + 阴性 siRNA组:以阴性 siRNA转染后加入NE 25 nmol/L;(5) Cdc42 siRNA组:无FBS培养基中加入Cdc42 siRNA 5 μmol/L预处理;(6) 阴性 siRNA组:以阴性 siRNA转染后,无FBS培养基培养。每组设5个复孔进行统计学分析,实验重复5次。

1.3 细胞转染 将处于对数生长期的细胞调整浓度至(1~2) × 10⁵/L,加入无双抗的培养基孵育12~24 h,当细胞融合达70%~80%时进行转染,按转染试剂Lipofectamine™ 2000说明书的实验步骤将Cdc42 siRNA及阴性对照转染入16HBE细胞中,以阴性 siRNA为阴性对照,转染后24~48 h进行细胞处理及相关检测。

1.4 Western印迹检测Cdc42蛋白含量 将细胞置于冰上,每孔加入100 μl的RIPA强裂解液(含PMSF: RIPA = 1 μl: 100 μl)裂解5 min,转移至提前预冷的EP管中匀速摇15 min,使细胞充分裂解。4℃条件下14 000 r/min离心15 min,用BCA蛋白分析试剂盒测定上清液总蛋白并调平。选择10% SDS-PAGE分离胶和5%浓缩胶,电泳跑胶,湿转至PVDF(0.45 μm)膜上。转膜后把膜放入QuickBlock Western封闭液中低速振荡封闭15 min。弃掉封闭液加入兔抗Cdc42蛋白一抗(1:500)匀速摇床30 min后放4℃摇床过夜。次日用1 × TBST洗膜3次加入HRP标记的二抗(1:1 000)室温下摇床1 h,再次洗膜后用滤纸吸取多余水份,滴加ECL化学发光底物,放置1~3 min。使用凝胶成像仪对膜进行曝光和显影,并用Image J软件分析

结果。GAPDH 作为内参蛋白,实验重复 3 次。

1.5 ELISA 法测 MUC5AC 蛋白水平 采用双抗夹心 ELISA 法检测样品中 MUC5AC 靶蛋白浓度。取 6 组已经过处理的细胞培养液,离心 20 min 后收集上清液。设置标准品孔、样本孔,标准品孔各加入不同浓度的标准品 50 μl,样本孔内加入待测样品 50 μl (10 μl 样品 + 40 μl 样品稀释液),每孔加入酶标试剂 100 μl (空白孔不加样品及酶标试剂),用封板膜封住反应孔置 37℃ 孵育 60 min。随后 PBS 洗板 5 次,拍干,每孔加入显色剂避光 15 min。加终止液 50 μl,测各孔 A 值 (λ = 450 nm),测量结果与标准品比值计算黏蛋白 MUC5AC 的相对值。

1.6 免疫荧光检测各组细胞 MUC5AC 蛋白表达 将贴壁生长良好的细胞消化后接种于 35 mm 玻底共聚焦培养皿中,细胞密度为 1 × 10⁵/ml,分别对各种细胞进行加药刺激。处理结束后 PBS 洗涤 3 次,每次 3 ~ 5 min,随后使用 4% 多聚醛室温下固定 30 min; PBS 洗涤 3 次,0.1 Triton X-100 室温下通透 20 min, PBS 洗涤 3 次,5% 山羊血清室温封闭 30 min,滴加 MUC5AC 蛋白一抗 (1:300) 后置于 4℃ 湿盒过夜;次日 PBS 洗 3 次,避光滴加羊抗鼠荧光二抗 (1:500) 室温放置 30 min; PBS 洗涤 3 次,避光滴加 DAPI 染色液 5 min; PBS 洗 3 遍,滴加防淬灭剂。共聚焦激光扫描生物显微镜下观察并拍片,采用 Image Pro Plus 软件分析细胞相对荧光强度。

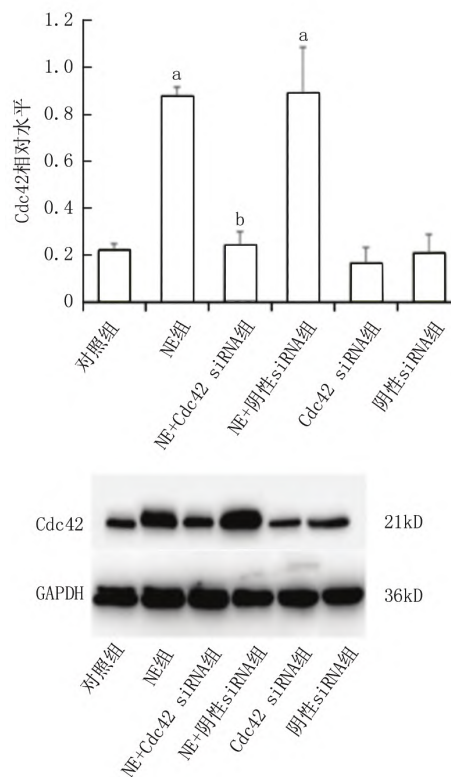
1.7 统计学处理 采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析。所有实验数据以 3 次及以上的重复实验为统计结果,正态分布计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数间比较采用 *t* 检验,多样本均数间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞内 Cdc42 蛋白表达水平比较 Cdc42 siRNA 组的 Cdc42 蛋白表达量相较于对照组和阴性 siRNA 组显著降低 (*P* < 0.05),表明转染成功。与对照组相比,NE 组以及 NE + 阴性 siRNA 组的 Cdc42 表达量有明显升高 (*P* < 0.001),显示 NE 可刺激 Cdc42 蛋白的表达; NE + Cdc42 siRNA 组相对于 NE 组其 Cdc42 蛋白表达有明显的下降 (*P* < 0.001);对照组与 NE + Cdc42 siRNA 组以及阴性 siRNA 组的 Cdc42 蛋白表达无明显差异 (*P* > 0.05),见图 1。

2.2 各组细胞分泌至上清液中的 MUC5AC 蛋白水平比较 与对照组相比,NE 组以及 NE + 阴性 siRNA 组 MUC5AC 蛋白分泌水平明显上升 (*P* < 0.001);而 NE + Cdc42 siRNA 组 MUC5AC 蛋白分泌水平与对照组比较差异无统计学意义 (*P* = 0.400),但与 NE 组以

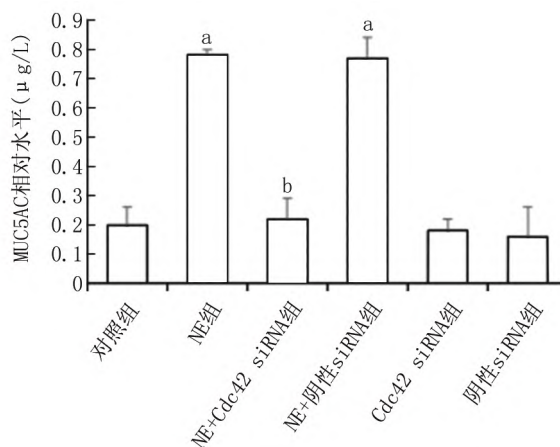
及 NE + 阴性 siRNA 组相比 MUC5AC 蛋白水平明显下降 (*P* < 0.001);对照组与阴性 siRNA 组比较 MUC5AC 蛋白水平无明显差异 (*P* = 0.450),见图 2。



注:与对照组比较,^a*P* < 0.001;与 NE 组比较,^b*P* < 0.001。

图 1 各组细胞内 Cdc42 蛋白的表达水平比较

Fig. 1 Comparison of the expression levels of Cdc42 protein in each group of cells



注:与对照组比较,^a*P* < 0.001;与 NE 组比较,^b*P* < 0.001。

图 2 各组细胞培养上清中 MUC5AC 蛋白水平比较

Fig. 2 Comparison of MUC5AC protein levels in cell culture supernatant of each group

2.3 各组细胞中 MUC5AC 蛋白水平比较 免疫荧光

结果显示,与对照组相比,NE 组和 NE + 阴性 siRNA 组的 MUC5AC 表达明显增高 ($P < 0.001$); NE + Cdc42 siRNA 组 MUC5AC 蛋白分泌与对照组相比差异无明显统计学意义 ($P > 0.05$),而与 NE 组以及 NE + 阴性 siRNA 组相比 MUC5AC 蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.05$);对照组与阴性 siRNA 组比较 MUC5AC 蛋白水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 3)。

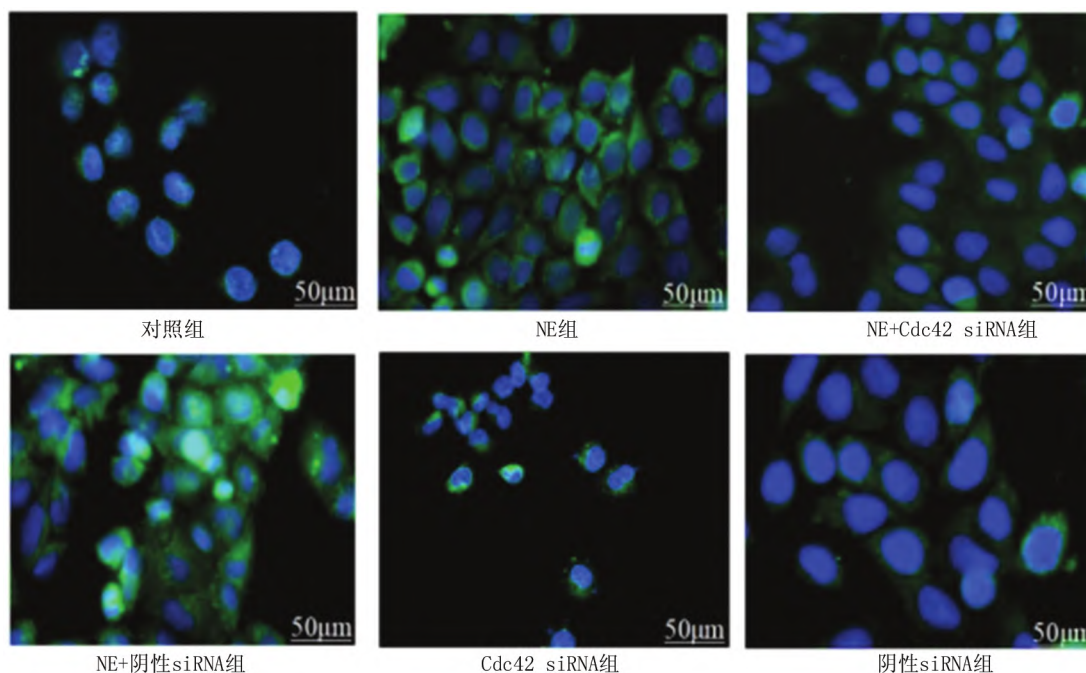
3 讨论

正常分泌的气道黏液能抵御部分外来的致病因子和刺激因子,起到保护气道、湿润空气等作用。但各种致病因子长期反复作用于气道黏膜时,会引起黏膜下腺体过度增生及杯状细胞过度化生,从而产生大量的黏稠黏液,表现为气道黏液高分泌。该状态是诸多慢性气道炎症性疾病如哮喘、慢性支气管炎等最早出现也是最常伴随的症状之一^[9]。此类疾病除了黏液分泌过多以外其纤毛清除功能也呈不同程度的下降,导致病理性的黏液无法随纤毛摆动而顺势排出,常随滞留时间的延长而形成黏液栓,有利于气道细菌的生存与繁殖,如此周而复始诱导气道黏液高分泌现象的进一步恶化,最终严重影响患者的治疗和预后^[10-11]。

NE 作为丝氨酸蛋白酶超家族成员,由中性粒细胞生成,是目前病理性黏蛋白高分泌过程中已知的最强刺激因子,破坏性极强,可诱导气道重塑引发肺纤维

化等^[12-13]。现已证实诸多促进黏蛋白生成的因素同时也会促进其分泌至胞外,而 Rho 蛋白是调控囊泡出胞的蛋白之一,其作为 GTPase 的 Ras 超家族成员,广泛存在于真核细胞中膜相关的细胞器内,当它与 GTP 结合时处于活性状态 (Rho-GTPase),与 GDP 结合时处于失活状态,该机制使其可通过类似分子开关的作用调控蛋白囊泡的出胞过程^[14]。而 Rho 蛋白又包含诸多亚型,如 Rac、Cdc42、Rif 等,其中 Cdc42 蛋白亚型是细胞极性建立过程中的关键因子,起初随机分布在细胞内,被激活后就会富集到细胞膜上,然后启动一系列下游生物过程,辅助相关蛋白囊泡的出胞运动^[15]。因此,气道炎症反应急性发作时出现的黏液分泌大量增多,很可能与胞内有极强的介导因素促使黏蛋白出胞相关^[16-17],故而 Cdc42 蛋白在黏液高分泌中的作用值得进一步详细研究。

本实验以 NE 作为刺激因子,构建黏液高分泌的体外细胞模型,分别对转染前和转染后的 16HBE 细胞进行刺激。结果发现,16HBE 在 NE 刺激后其细胞外 MUC5AC 以及细胞内的 Cdc42 蛋白水平表达明显增加;而转染 Cdc42 siRNA 后,再用 NE 刺激,胞内 Cdc42 蛋白水平分泌量相较对照组没有明显升高,相较于 NE 组却出现了明显的下降,同时上清液中的 MUC5AC 与



注:绿色荧光表示 MUC5AC 蛋白,蓝色荧光表示细胞核。

图 3 各组细胞中 MUC5AC 蛋白的表达水平比较

Fig. 3 Comparison of the expression levels of MUC5AC protein in each group of cells

之结果相一致。由此可见,NE 这些促黏液因子会通过刺激 Cdc42 蛋白的表达,进而促进 MUC5AC 的分泌和出胞,反之亦然。因此推测抑制 Cdc42 蛋白很可能成为控制慢性气道炎性疾病的病理性黏液高分泌的又一重要靶点。

综上所述,Cdc42 蛋白是 NE 刺激下气道 MUC5AC 蛋白高分泌的重要上游信号分子。但 Cdc42 如何促进 MUC5AC 出胞的具体膜介导机制还尚不十分清楚,未来需要更多的体内和体外实验来进一步阐明 Cdc42 在黏液高分泌中的确切机制。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

何明欣:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;周向东、李琪、张华:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;徐立:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;杨雅楼:进行统计学分析

参考文献

[1] Du X ,Yang Y ,Yang M ,et al. ITGB4 deficiency induces mucus hypersecretion by upregulating MUC5AC in RSV-infected airway epithelial cells[J]. *Int J Biol Sci* ,2022 ,18 (1) : 349-359. DOI: 10. 7150/ijbs. 66215.

[2] 覃英娇,周向东,李琪,等.血清 PCT、IL-13 与 AECOPD 伴气道黏液高分泌患者临床预后的相关性[J]. *疑难病杂志* ,2022 ,21 (9) : 927-931. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2022. 09. 008.

Qin YJ ,Zhou XD ,Li Q ,et al. Correlation of serum PCT ,IL-13 and clinical prognosis in AECOPD patients with airway mucus hypersecretion[J]. *Chinese Journal of Difficult and Complicated* ,2022 ,21 (9) : 927-931. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450.

[3] Voynow JA ,Shinbashi M. Neutrophil elastase and chronic lung disease[J]. *Biomolecules* 2021 ,11 (8) : 1065-1082. DOI: 10. 3390/biom11081065.

[4] 何明欣,张华,周向东,等.危重症患者气道黏液高分泌药物及物理治疗技术的研究进展[J]. *中国急救医学* ,2022 ,42 (3) : 264-269. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-1949. 2022. 03. 015.

He MX ,Zhang H ,Zhou XD ,et al. Research progress of drugs and physical therapy techniques of airway mucus hypersecretion in critically ill patients [J]. *Chinese Journal of Critical Care Medicine* , 2022 ,42 (3) : 264-269. DOI: 10. 3969/ j. issn. 1002-1949. 2022. 03. 015.

[5] Sun Y ,Shi Z ,Lin Y ,et al. Benzo pyrene induces MUC5AC expression through the AhR/mitochondrial ROS/ERK pathway in airway epithelial cells[J]. *Ecotoxicol Environ Saf* 2021 ,21 (1) : 857. DOI: 10. 1016/j. ecoenv. 2020. 857.

[6] Kesimer M. Mucins MUC5AC and MUC5B in the airways: MUCing around together [J]. *Am J Respir Crit Care Med* ,2022 ,206 (9) : 1055-1057. DOI: 10. 1164/rccm. 202208-4459ED.

[7] Crosas ME ,Samain R ,Kohlhammer L ,et al. Rho GTPase signaling in cancer progression and dissemination [J]. *Physiol Rev* ,2022 ,102 (1) : 455-510. DOI: 10. 1152/physrev. 00045. 2020.

[8] Mosaddeghzadeh N ,Ahmadian MR. The rho family gtpases: Mechanisms of regulation and signaling [J]. *Cells* ,2021 ,10 (7) : 1831.

DOI: 10. 3390/ cells10071831.

[9] Peng Y ,Wang ZN ,Xu AR ,et al. Mucus hypersecretion and ciliary impairment in conducting airway contribute to alveolar mucus plugging in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Cell Dev Biol* 2022 , 31 (9) : 842. DOI: 10. 3389/ fcell. 2021. 842.

[10] 何明欣,张华,周向东,等.白细胞介素-1 受体相关激酶通过 TLR4/MyD88 信号通路调控内毒素诱导的气道黏液高分泌[J]. *中国呼吸与危重监护杂志* ,2022 ,21 (1) : 50-54. DOI: 10. 7507/1671-6205. 20200214.

He MX ,Zhang H ,Zhou XD ,et al. Interleukin-1 receptor associated kinase regulates lipopolysaccharide-induced airway mucus hypersecretion through a TLR-4/MyD88 related pathway [J]. *Chinese Journal of Respiratory and Critical Care* 2022 ,21 (1) : 50-54. DOI: 10. 7507/1671-6205. 20200214.

[11] Singanayagam A ,Footitt J ,Marczynski M ,et al. Airway mucins promote immunopathology in virus-exacerbated chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Clin Invest* ,2022 ,132 (8) : 901. DOI: 10. 1172/JCI120901.

[12] Kummarapurugu AB ,Zheng S ,Ma J ,et al. Neutrophil elastase triggers the release of macrophage extracellular traps: Relevance to Cystic Fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* ,2022 ,66 (1) : 76-85. DOI: 10. 1165/rccb. 2020-0410OC.

[13] Szturmowicz M ,Demkow U. Neutrophil extracellular traps (NETs) in severe SARS-COV-2 lung disease [J]. *Int J Mol Sci* 2021 ,22 (16) : 8854. DOI: 10. 3390/ijms 22168854.

[14] 曾曼,李琪,周向东,等.冷刺激对细颗粒物致气道上皮炎症反应的增敏效应及冷诱导 RNA 结合蛋白的转录后调控机制[J]. *中国呼吸与危重监护杂志* ,2021 ,20 (3) : 195-202. DOI: 10. 7507/1671-6205. 202001023.

Zeng M ,Li Q ,Zhou XD ,et al. The synergistic effect of cold stress plus particulate matter 2. 5 co-exposure on the occurrence of respiratory inflammation and the post-transcriptional mechanism of cold inducible RNA-binding protein [J]. *Chinese Journal of Respiratory and Critical Care* , 2021 ,20 (3) : 195-202. DOI: 10. 7507/1671-6205. 202001023.

[15] Miller KE ,Kang PJ ,Park H. Regulation of Cdc42 for polarized growth in budding yeast [J]. *Microb Cell* ,2020 ,7 (7) : 175-189. DOI: 10. 15698/mic2020. 07. 722.

[16] 王晋红,赵海,冯涛,等.基于气道黏液高分泌性探讨免疫调节剂联合布地格福治疗慢性阻塞性肺疾病效果及机制[J]. *疑难病杂志* ,2023 ,22 (2) : 119-123 ,131. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2023. 02. 002.

Wang JH ,Zhao H ,Feng T ,et al. Study on the effect and mechanism of immunomodulator combined with budesonide on chronic obstructive pulmonary disease based on airway mucus hypersecretion [J]. *Chinese Journal of Difficult and Complicated* ,2023 ,22 (2) : 119-123 ,131. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2023. 02. 002.

[17] 贾盼红,熊晓媛,李琪,等. Apelin/APJ 在人支气管上皮细胞炎症反应中的作用及地胆头对其影响的研究[J]. *中国免疫学杂志* , 2022 ,38 (9) : 1025-1029. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-484X. 2022. 09. 001.

(收稿日期:2022-12-14)