

## 基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.001434

## 黄芩苷对急性肺损伤大鼠肺泡液体清除作用的研究

邓 嘉<sup>1</sup>,王导新<sup>2</sup>,梁爱玲<sup>1</sup>,唐 静<sup>1</sup>,向大开<sup>1</sup>,何宗林<sup>1</sup>

(1. 重庆市江北区中医院肺科,重庆 400020;2. 重庆医科大学附属第二医院呼吸科,重庆 400010)

**【摘要】目的:**用脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)诱导大鼠急性肺损伤,探讨黄芩苷对大鼠肺泡液体清除的效应。**方法:**将 SD 大鼠分为空白对照组、LPS 诱导急性肺损伤(acute lung injury,ALI)组及 ALI+黄芩苷预处理组。根据黄芩苷预处理浓度再分为 10、50、100 mg/kg 3 个亚组。经 LPS 及不同浓度黄芩苷作用不同时间(2、4、6 h)后,计算肺湿/干重(W/D)比值,放射免疫分析法测定大鼠肺组织中环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate,cAMP)水平,观察肺组织病理学改变,并测量肺泡液体清除率(alveolar fluid clearance,AFC)变化。每组或亚组各 5 只大鼠。**结果:**黄芩苷预处理后,ALI 大鼠肺组织含水量[黄芩苷 10 mg/kg 组( $7.94 \pm 1.14$ );黄芩苷 50 mg/kg 组( $6.13 \pm 1.34$ );黄芩苷 100 mg/kg 组( $5.38 \pm 1.43$ )]较模型组( $9.88 \pm 1.53$ )明显减少( $P < 0.05$ ),cAMP 含量[黄芩苷 10 mg/kg 组( $381.00 \pm 60.51$ ) pmol/g;黄芩苷 50 mg/kg 组( $493.40 \pm 63.93$ ) pmol/g;黄芩苷 100 mg/kg 组( $582.40 \pm 47.44$ ) pmol/g]较模型组[( $265.8 \pm 62.39$ ) pmol/g]明显增加( $P < 0.05$ ),两者结果均随着预处理黄芩苷的浓度增加而增加。ALI+黄芩苷组较 ALI 组肺间质水肿明显减轻,炎症细胞浸润明显减少。黄芩苷预处理组各时间点 AFC 明显高于 ALI 组,并随黄芩苷预处理浓度增加而增加( $P < 0.05$ ),且大鼠肺组织内 cAMP 水平与 AFC 呈正相关( $r=0.984, P=0.002$ )。但在加入阿米洛利后,各组 AFC 明显下降,且各组间无明显差异( $P > 0.05$ )。**结论:**黄芩苷能够改善 ALI 大鼠肺泡液体清除,其可能途径为增加细胞内 cAMP 水平从而调节上皮钠通道功能。

**【关键词】**黄芩苷;急性肺损伤;肺泡液体清除**【中图分类号】**R563.8**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-02-04

## Effect of baicalin on alveolar fluid clearance in rats with acute lung injury

Deng Jia<sup>1</sup>, Wang Daoxin<sup>2</sup>, Liang Ailing<sup>1</sup>, Tang Jing<sup>1</sup>, Xiang Dakai<sup>1</sup>, He Zonglin<sup>1</sup>

(1. Department of Respiratory Medicine, Traditional Chinese Medical Hospital of Jiangbei District;

2. Department of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To research the effect of baicalin on alveolar fluid clearance(AFC) in rats with acute lung injury(ALI) induced by lipopolysaccharides(LPS). **Methods:** Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into control group, ALI group and baicalin pretreatment group(ALI+baicalin group), with 5 rats in each group. The ALI+baicalin group was further divided into three subgroups with different concentrations(10, 50, 100 mg/kg). SD rats in each group were killed for measurement of ratio of wet to dry(W/D) weight of lung tissue, cyclic adenosine monophosphate(cAMP) level by radioimmunoassay, pathological changes and AFC at 2, 4 and 6 h. **Results:** Compared with ALI group[W/D weight: ( $9.88 \pm 1.53$ ); concentration of cAMP: ( $265.80 \pm 62.39$ ) pmol/g], baicalin pretreatment[baicalin 10 mg/kg group: ( $7.94 \pm 1.14$ ); baicalin 50 mg/kg group: ( $6.13 \pm 1.34$ ); baicalin 100 mg/kg group: ( $5.38 \pm 1.43$ )] significantly decreased W/D weight of lung tissue( $P < 0.05$ ), and [baicalin 10 mg/kg group: ( $381.00 \pm 60.51$ ) pmol/g; baicalin 50 mg/kg group: ( $493.40 \pm 63.93$ ) pmol/g; baicalin 100 mg/kg group: ( $582.40 \pm 47.44$ ) pmol/g] significantly increased concentration of cAMP in lung tissue( $P < 0.05$ ) in a dose-dependent manner with increasing doses. Interstitial edema and inflammatory cell infiltration were markedly decreased when being pretreated with baicalin. AFC was significantly increased in ALI+baicalin group in a dose-dependent manner at different intervals( $P < 0.05$ ). Meanwhile, cAMP concentration in lung tissue was positive correlated with AFC( $r=0.984, P=0.002$ ). Addition of amiloride to the instillate decreased fluid clearance significantly. Baicalin or LPS had no significant effect on AFC

in rats with ALI as amiloride being added in the instillate( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Baicalin alleviates low AFC in rats with ALI probably by increasing intercellular cAMP level to modulate epithelial sodium channel.

**【Key words】**baicalin; acute lung injury; alveolar fluid clearance

作者介绍:邓 嘉, Email:375131161@qq.com,

研究方向:呼吸危重症的基础和临床研究。

基金项目:重庆市卫生计生委医学科研计划资助项目(编号:2015ZBXM042)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1712.052.html>  
(2017-11-28)

黄芩作为我国重要的中草药之一,主要用于治疗感染性疾病。黄芩苷是黄芩的主要提取物之一。近期研究表明,黄芩苷除了抗炎作用外,在多器官功能衰竭、急性胰腺炎及急性肺损伤大鼠模型中,均能明显减轻肺水肿,增加存活率。但至今对黄芩苷作用——肺泡液体清除的影响尚未阐明。本实验通过脂多糖诱导急性肺损伤(acute lung injury, ALI)大鼠模型,观察黄芩苷对肺泡液体清除率(alveolar fluid clearance, AFC)的调控作用,并探讨其中作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

65 只成年雄性 SD 大鼠,体质量( $240 \pm 20$ ) g,购于北京实验动物研究中心(SYXK 京 2011-0006)。LPS 批号及规格:L2880-10 mg;黄芩苷批号及规格:572667-1 g;阿米洛利批号及规格:A4562-25 mg;戊巴比妥批号及规格:P3761-5 g 和伊文思蓝批号及规格:E2129-1 g 均购自美国 Sigma 公司。cAMP 放射免疫试剂盒货号 FR-001 购自美国 Milipore 公司。

### 1.2 动物分组

1.2.1 LPS 及黄芩苷干预分组 用戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉 SD 大鼠,然后仰卧固定。随机分为:①空白对照组:将等量生理盐水经腹腔注入大鼠体内,作用时间为 6 h;②ALI 组:经腹腔注射 LPS(10 mg/kg)制作 ALI 模型,分别作用 2、4、6 h;③ALI+黄芩苷组:先经腹腔注射不同浓度黄芩苷,30 min 后再注射 LPS,分为 ALI+黄芩苷 10 mg/kg、ALI+黄芩苷 50 mg/kg 及 ALI+黄芩苷 100 mg/kg 3 个亚组,每个亚组分别作用 2、4、6 h。每组或各亚组大鼠均为 5 只。杀死大鼠后取其带气管肺组织。左肺用于测定肺湿/干重及 cAMP 浓度测定,右肺用于测定 AFC。

1.2.2 离体肺组织肺泡液体清除率测定的分组 ①空白对照组:大鼠经腹腔注射等量生理盐水作用 6 h 后,处死大鼠后将气管导管置入右下肺,然后行右下肺灌注液滴入;②阿米洛利(amiloride)组:大鼠经腹腔注射等量生理盐水作用 6 h 后,滴入右下肺内含阿米洛利( $10^{-3}$  mol/L)的灌注液;③ALI 组:大鼠经 LPS 作用 6 h 后,给予右下肺灌注液;④ALI+阿米洛利组:LPS 经腹腔注入大鼠 6 h 后,滴入右下肺内含阿米洛利( $10^{-3}$  mol/L)的灌注液;⑤ALI+黄芩苷组:分为 ALI+黄芩苷 10 mg/kg、ALI+黄芩苷 50 mg/kg 及 ALI+黄芩苷 100 mg/kg 3 个亚组;⑥ALI+黄芩苷+阿米洛利组:大鼠经腹腔注入黄芩苷、LPS 作用 6 h 后,滴入右下肺内含  $10^{-3}$  mol/L 阿米洛利的灌注液。每组均为 5 只大鼠。各组大鼠离体右下肺在滴入灌注液后行机械通气 1 h,再吸取肺泡液体测定 AFC。

### 1.3 肺湿/干重(W/D)比值测定

杀死大鼠后分离其左侧肺组织,用天平称量其湿重(W),然后放入 80 °C 烤箱烘烤,脱水 72 h 后称量其干重(D),计算 W/D 比值。W/D 比值=(肺湿重-肺干重)/肺干重。

### 1.4 病理形态学检查

取下大鼠右下肺,经 10%甲醛溶液固定 48 h,经苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色后,最后用 100 × 光镜观察肺间质及肺泡病理学改变。

### 1.5 肺组织 cAMP 含量测定

将各组处死大鼠分离左侧肺组织并剪碎,用 20 mmol/L pH 7.4 PBS、1 mmol/L PMSF 和  $\beta$  巯基乙醇及 EDTA、5 g/L Triton × 100 制成匀浆介质,用匀浆介质与剪碎后的肺组织按 1:9 比例充分混合,再用玻璃匀浆器研磨充分,离心后取上清液,用放射免疫分析试剂盒测定 cAMP 含量。

### 1.6 离体肺组织肺泡液体清除率的测定

大鼠经 LPS 或生理盐水作用 6 h 后处死,然后分离出全部气管、肺脏及心脏。将气管导管置入离体右下肺,将灌注液(每 mL 溶液含 0.15 mg 伊文思蓝标记的 5%白蛋白等渗生理盐水)以 4 mL/kg 经气管导管滴入右下肺下叶,再予 2 mL 氧气注入确保灌注液到达肺脏。在 100%氧气浓度下,保持气道压在 650~700 Pa,再行机械通气 1 h。吸取 0.2 mL 离体右下肺液体,用分光光度计在 620 nm 处测定白蛋白吸光度值并计算 AFC。

### 1.7 统计学分析

实验数据用 SPSS 22.0 软件进行分析处理,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,肺组织湿/干重比、cAMP 浓度及阿米洛利对 AFC 变化用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法;黄芩苷预处理后不同时间点 AFC 变化采用重复测量方差分析;相关性分析采用 Pearson 相关分析法。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 肺组织湿/干重比值

LPS 作用 6 h 后模型组肺组织含水量与对照组相比明显增加( $P<0.01$ );给予黄芩苷预处理后,ALI 大鼠肺组织含水量较模型组显著减少,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且肺含水量的减少程度与预处理黄芩苷之间呈浓度依赖(表 1)。

表 1 黄芩苷对 ALI 大鼠肺组织湿/干重比值

| 组别                  | 例数 | W/D 值             | F 值    | P 值   |
|---------------------|----|-------------------|--------|-------|
| 空白对照组               | 5  | $3.89 \pm 1.16$   |        |       |
| ALI 模型组(6 h)        | 5  | $9.88 \pm 1.53^a$ |        |       |
| ALI+黄芩苷组(10 mg/kg)  | 5  | $7.94 \pm 1.14^b$ | 15.245 | 0.000 |
| ALI+黄芩苷组(50 mg/kg)  | 5  | $6.13 \pm 1.34^c$ |        |       |
| ALI+黄芩苷组(100 mg/kg) | 5  | $5.38 \pm 1.43^c$ |        |       |

注:a,与对照组相比, $P=0.000$ ;b,与 ALI 模型组相比, $P=0.032$ ;c,与 ALI 模型组相比, $P=0.000$

## 2.2 肺组织 cAMP 浓度测定

LPS 作用 6 h 后肺组织匀浆中 cAMP 含量较对照组明显减少 ( $P<0.01$ ); 黄芩苷预处理后 ALI 大鼠 cAMP 含量较模型组显著增加 ( $P<0.05$ ), 肺组织匀浆中 cAMP 含量随着预处理黄芩苷的浓度增加而增加 (表 2)。

表 2 黄芩苷对肺组织匀浆中 cAMP 含量的影响

| 组别                   | 例数 | cAMP 浓度<br>(pmol/g)         | F 值    | P 值   |
|----------------------|----|-----------------------------|--------|-------|
| 空白对照组                | 5  | 669.60 ± 82.65              |        |       |
| ALI 模型组 (6 h)        | 5  | 265.80 ± 62.39 <sup>a</sup> |        |       |
| ALI+黄芩苷组 (10 mg/kg)  | 5  | 381.00 ± 60.51 <sup>b</sup> | 30.847 | 0.000 |
| ALI+黄芩苷组 (50 mg/kg)  | 5  | 493.40 ± 63.93 <sup>c</sup> |        |       |
| ALI+黄芩苷组 (100 mg/kg) | 5  | 582.40 ± 47.44 <sup>c</sup> |        |       |

注: a, 与对照组相比,  $P=0.000$ ; b, 与 ALI 模型组相比,  $P=0.010$ ; c, 与 ALI 模型组相比,  $P=0.000$

## 2.3 肺组织病理变化

与空白对照组肺组织 (图 1A) 相比, LPS 作用后大鼠 (图 1B) 肺泡完整性破坏, 部分肺泡萎陷, 肺间质明显水肿增厚, 大量炎症细胞浸润。经黄芩苷干预后, 大鼠 (图 1C) 较 LPS 作用组肺泡结构有所恢复, 肺间质水肿减轻, 炎症细胞浸润减少。

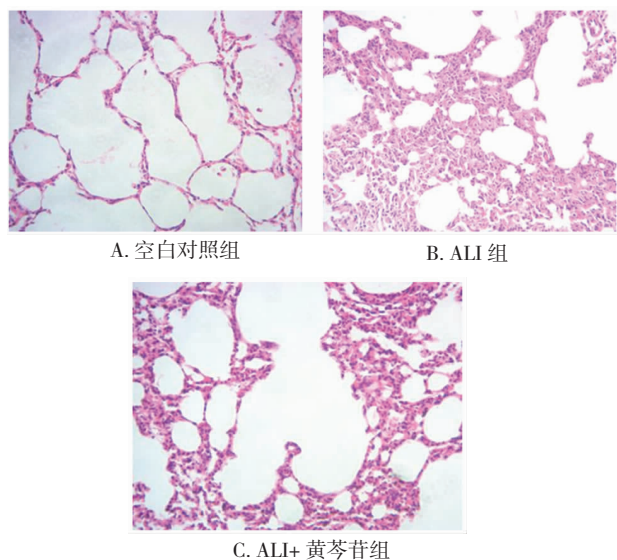


图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色结果 (100×)

## 2.4 不同浓度黄芩苷预处理后不同时间点 AFC 变化

重复测量方差分析显示, 药物分组之间 AFC 差异有统计学意义 ( $F=48.191, P=0.000$ )。3 个时间分组的 AFC 差异有统计学意义 ( $F=14.891, P=0.000$ ); 但时间分组和药物分组无交互作用 ( $F=1.082, P=0.394$ ), 提示时间因素的作用不随药物分组的不同而不同。LPS 作用后 AFC 较空白对照组大鼠明显降低, 并随着时间延长进行性下降 ( $P<0.01$ ); 给予黄芩苷预处理后, 各时间点治疗组 AFC 明显高于 ALI 组, 并随黄芩苷

预处理浓度增加而增加 ( $P<0.05$ ), 见表 3。

表 3 不同浓度黄芩苷预处理后不同时间点 AFC 变化

| 组别                      | 2 h                       | 4 h                       | 6 h                       |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 空白对照组                   | 20.00 ± 2.55              | 20.00 ± 2.55              | 20.00 ± 2.55              |
| ALI 模型组                 | 6.60 ± 1.51               | 5.80 ± 0.83               | 4.60 ± 1.14               |
| ALI+黄芩苷组<br>(10 mg/kg)  | 11.00 ± 1.58 <sup>a</sup> | 9.60 ± 1.67 <sup>a</sup>  | 8.80 ± 1.92 <sup>a</sup>  |
| ALI+黄芩苷组<br>(50 mg/kg)  | 14.20 ± 2.38 <sup>b</sup> | 12.60 ± 1.81 <sup>b</sup> | 11.40 ± 2.07 <sup>b</sup> |
| ALI+黄芩苷组<br>(100 mg/kg) | 17.20 ± 2.23 <sup>c</sup> | 15.40 ± 2.61 <sup>c</sup> | 14.40 ± 1.51 <sup>c</sup> |

注: a, 与 ALI 模型组相比,  $P=0.001$ ; b, 与 ALI+黄芩苷组 (10 mg/kg) 相比,  $P=0.016$ ; c, 与 ALI+黄芩苷组 (50 mg/kg) 相比,  $P=0.016$

## 2.5 肺组织 cAMP 水平与 AFC 变化的相关性分析

以各组作用 6 h 为观察点, 大鼠肺组织内 cAMP 水平与 AFC 呈正相关 ( $r=0.984, P=0.002$ )。

## 2.6 阿米洛利对 AFC 变化的影响

阿米洛利组 AFC 较空白对照组及 ALI 组明显降低 ( $P<0.01$ )。经黄芩苷 (100 mg/kg) 预处理后 AFC 较 ALI 组明显增加 ( $P<0.01$ )。但各组在加入阿米洛利后, 各组间 AFC 无明显差异 ( $P>0.05$ ), 提示黄芩苷增加 AFC 的作用被抑制, 见表 4。

表 4 各组作用 6 h 后大鼠肺组织肺泡液体清除率比较

| 组别           | 例数 | AFC                        | F 值     | P 值   |
|--------------|----|----------------------------|---------|-------|
| 空白对照组        | 5  | 20.00 ± 2.55               |         |       |
| 阿米洛利         | 5  | 2.40 ± 1.14 <sup>a,d</sup> |         |       |
| ALI          | 5  | 4.60 ± 1.14                |         |       |
| ALI+阿米洛利     | 5  | 2.20 ± 0.84 <sup>b,d</sup> | 129.913 | 0.000 |
| ALI+黄芩苷      | 5  | 14.40 ± 1.51 <sup>c</sup>  |         |       |
| ALI+黄芩苷+阿米洛利 | 5  | 2.60 ± 1.14 <sup>c,d</sup> |         |       |

注: a, 与 ALI 相比,  $P=0.046$ ; b, 与阿米洛利组相比,  $P=0.678$ ; c, 与阿米洛利组相比,  $P=0.535$ ; d, 与 ALI+黄芩苷组相比,  $P=0.000$ ; e, 与 ALI 组相比,  $P=0.000$

## 3 讨论

大量研究表明, 黄芩苷在抗感染、抗肿瘤、抗纤维化及抗血小板聚集等方面均有重要作用<sup>[1]</sup>。在脓毒症、急性肺损伤、急性胰腺炎动物模型中, 黄芩苷下调 Toll 样受体 4 表达<sup>[2]</sup>, 抑制 CX3CL1-CX3CR1 轴和 NF- $\kappa$ B 信号途径的交互应答作用<sup>[3]</sup>, 减少高迁移率族蛋白 B1 释放<sup>[4]</sup>, 从而发挥抑制炎症反应、改善预后的治疗作用。上述研究中另一个重要发现为黄芩苷除抗炎反应外, 在肺损伤形成过程中能够减轻肺水肿。本研究结果显示, 黄芩苷能够减轻 LPS

诱导的 ALI 大鼠肺水肿。AFC 用于描述体内肺泡内液体形成及清除之间的关系。临床研究发现,肺泡水肿液的重吸收与 ALI 患者的病情恢复明显相关,肺泡水肿液重吸收越快,ALI 患者纠正呼吸衰竭的速度越快,死亡率下降;反之则呼吸衰竭加重,死亡率明显升高。因此,提高 AFC 对改善 ALI 预后具有重要作用。本研究中,黄芩苷预处理后 ALI 大鼠 AFC 显著增加,且呈浓度依赖关系。提示黄芩苷减轻 ALI 肺水肿的作用是通过改善肺泡内液体清除能力实现的。

肺泡上皮细胞内有多条离子通道可以调控 AFC,主要包括水通道和 ENaC。但目前认为,ENaC 是肺泡内钠水重吸收的限速步骤。ENaC 将钠离子从肺泡内主动转运至上皮细胞内,然后通过基底膜侧的 Na,K-ATP 酶再将钠离子主动转运至肺间质。它是肺泡液体重吸收环节中的首要限速步骤<sup>[5]</sup>。阿米洛利被认为是 ENaC 的特异性阻断剂,抑制其对肺泡内钠离子的转运。研究表明,在加入阿米洛利后,完全清除了预处理黄芩苷对 AFC 的提升作用,相比阿米洛利单独作用时的 AFC,两者之间差异不显著,提示黄芩苷调控 AFC 的途径可能与阿米洛利的调控通路是相同的。因此,黄芩苷很可能通过调节 ENaC 功能或其表达从而提高 ALI 大鼠 AFC。

既往研究结果提示,cAMP 是肺泡内 ENaC 调控的重要信号分子。在肺上皮细胞中,外源性 cAMP 可以通过增加  $\alpha$ -ENaC 表达促进阿米洛利敏感性上皮钠转运<sup>[6]</sup>。在 H441 上皮细胞上,cAMP 可以增加合成的  $\alpha$ -ENaC 由胞内向顶膜侧迁移,从而增强钠离子转运<sup>[7]</sup>。同时,膜片钳技术显示,cAMP 还能增加有效的 ENaC 数目及开放率<sup>[8]</sup>。综合起来,cAMP 在 ENaC 表达、胞内 ENaC 向顶膜侧转运及调控 ENaC 功能方面均发挥重要作用。本研究中,随着黄芩苷预处理浓度的增加,肺组织内 cAMP 水平在各个时间点上均进行性增加,较 ALI 组有统计学差异。在 H441 细胞实验中,黄芩苷诱导细胞色素 C 氧化酶差异化表达,从而增加细胞内 cAMP 水平<sup>[9]</sup>,与本实验结果相一致。进一步做相关性分析提示,cAMP 浓度与 AFC 呈正相关。所以,黄芩苷对 AFC 的调控作用是通过增加细胞内 cAMP 浓度实现的。在肠系膜动脉舒张调控中,黄芩苷增加 cAMP 水平从而增强大电导钙离子依赖的钾通道,提示黄芩苷能够通过

调节 cAMP 水平改善细胞内离子通道功能<sup>[10]</sup>。而 ALI 大鼠 AFC 的改善很可能是胞内 cAMP 增加调控 ENaC 功能或其表达的结果。

总之,黄芩苷能够改善 ALI 大鼠肺泡液体清除,其可能途径为增加细胞内 cAMP 水平从而影响 ENaC。因而进一步研究着重在于探讨黄芩苷对 ENaC 表达或功能调控的影响及其作用的可能信号途径。

## 参 考 文 献

- [1] Fowler ZL, Shah K, Panepinto JC, et al. Development of non-natural flavanones as antimicrobial agents[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):25681–25686.
- [2] Ciu L, Feng L, Zhang ZH, et al. The anti-inflammation effect of baicalin on experimental colitis through inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B pathway activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(1):294–303.
- [3] Ding XM, Pan L, Wang Y, et al. Baicalin exerts protective effects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by regulating the crosstalk between the CX3CL1–CX3CR1 axis and NF- $\kappa$ B pathway in CX3CL1–knockout mice[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(3):703–715.
- [4] Wang H, Liu D. Baicalin inhibits high-mobility group box 1 release and improves survival in experimental sepsis[J]. *Shock*, 2014, 41(4):324–330.
- [5] Shimko MJ, Zacccone EJ, Thompson JA, et al. Nerve growth factor reduces amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> transport in human airway epithelial cells[J]. *Physiol Rep*, 2014, 2(7):12073–12084.
- [6] Roos KP, Bugaj V, Mironova E, et al. Adenylyl cyclase VI mediates vasopressin-stimulated ENaC activity[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(2):218–227.
- [7] Butler PL, Staruschenko A, Snyder PM. Acetylation stimulates the epithelial sodium channel by reducing its ubiquitination and degradation[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(20):12497–12503.
- [8] Takemura Y, Helms MN, Eaton AF, et al. Cholinergic regulation of epithelial sodium channels in rat alveolar type 2 epithelial cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 304(6):428–437.
- [9] Kam WW, Lake V, Banos C, et al. Apparent polyploidization after gamma irradiation: pitfalls in the use of quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for the estimation of mitochondrial and nuclear DNA gene copy numbers[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6):11544–11559.
- [10] Lin YL, Dai ZK, Lin RJ, et al. Baicalin, a flavonoid from *Scutellaria baicalensis* Georgi, activates large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels via cyclic nucleotide-dependent protein kinases in mesenteric artery[J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(10):760–770.

(责任编辑:冉明会)