

基于转录组学探讨小青龙汤治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制

付梓涵¹, 王云超², 黑暹橙¹, 付祥¹, 杨震^{1*}, 王新华^{1*}

1. 甘肃中医药大学公共卫生学院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃中医药大学基础医学院, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 基于转录组学分析小青龙汤治疗慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的作用机制。**方法** 雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松 (1 mg/kg) 组和小青龙汤低、中、高剂量 (1.46、0.73、0.36 g/kg) 组, 每组 8 只。除对照组外, 其余各组小鼠采用烟草提取物联合脂多糖鼻内滴注法构建 COPD 模型。连续给药 4 周, 观察各组小鼠的一般状态, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察小鼠肺组织病理变化, 采用 ELISA 测定血清中炎症因子水平; 采用转录组学测序技术分析对照组、模型组和小青龙汤高剂量组小鼠肺组织的基因表达谱, 并对显著差异表达的基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析; 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测小鼠肺组织中环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路相关基因及蛋白的表达。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠一般状态差, 肺组织可见明显病理损伤, 血清中炎症因子水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠一般状态、肺组织损伤情况均得到不同程度的改善, 血清中炎症因子水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中小青龙汤高剂量组和地塞米松组改善作用最为明显。转录组学分析结果表明, 对照组 vs 模型组和模型组 vs 小青龙汤高剂量组差异表达基因广泛参与了 cAMP 信号通路、神经活性配体-受体相互作用、昼夜节律等相关信号通路。qRT-PCR 和 Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 cAMP、PKA、CREB 表达显著降低 ($P < 0.01$), VEGF 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 小青龙汤高剂量组小鼠肺组织中 cAMP、PKA、CREB 表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), VEGF 表达显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 小青龙汤可显著减少 COPD 小鼠气道炎症细胞浸润、减轻肺部气道重塑, 并通过调控 cAMP 信号通路, 治疗 COPD。

关键词: 小青龙汤; 慢性阻塞性肺疾病; 转录组学; 环磷酸腺苷信号通路; 血管内皮生长因子; 炎症因子; 麻黄碱; 桂皮醛
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)08-2849-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.08.020

Mechanism of Xiaoqinglong Decoction in treatment of chronic obstructive pulmonary disease based on transcriptomics

FU Zihan¹, WANG Yunchao², HEI Xiancheng¹, FU Xiang¹, YANG Zhen¹, WANG Xinhua¹

1. School of Public Health, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. School of Basic Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Xiaoqinglong Decoction (小青龙汤) in treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) based on transcriptomics analysis. **Methods** Male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, dexamethasone (1 mg/kg) group, and Xiaoqinglong Decoction low-, medium-, high-dose (1.46, 0.73, 0.36 g/kg) groups, with eight mice in each group. Except for the control group, all other groups of mice were used to construct COPD models by intranasal infusion of tobacco extract combined with lipopolysaccharide. After continuous administration for four weeks, the general status of mice in each group were observed, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in lung tissue of mice, ELISA was used to measure the levels of inflammatory factors in serum; Transcriptome sequencing technology was used to analyze the gene expression profiles of lung tissues in control group, model group and Xiaoqinglong Decoction high-dose group, gene

收稿日期: 2024-11-15

基金项目: 甘肃省高等学校产业支撑计划项目 (2022CYZC-53); 甘肃省青年博士支持项目 (2023QB-092); 兰州市科技计划项目 (2023-ZD-151)

作者简介: 付梓涵, 硕士研究生, 从事中医药干预慢性阻塞性肺疾病作用机制研究。E-mail: zihanfu1999@163.com

*通信作者: 王新华, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事慢性非传染性疾病的防控研究。E-mail: wxh@gszy.edu.cn

杨震, 博士, 副教授, 从事中药学及呼吸系统疾病相关研究。E-mail: yangzh2012lzu@126.com

ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed on significantly differentially expressed genes; qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expressions of genes and proteins related to cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway in lung tissue. **Results** Compared with control group, mice in model group showed poor general condition, significant pathological damage in lung tissue, and significantly increased levels of inflammatory factors in serum ($P < 0.01$); Compared with model group, the general condition and lung tissue damage of mice in each treatment group were improved to varying degrees, and the levels of inflammatory factors in serum were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). Among them, Xiaoqinglong Decoction high-dose group and dexamethasone group had the most significant improvement effect. The transcriptome analysis results showed that the differentially expressed genes between control group and model group, as well as Xiaoqinglong Decoction high-dose group were widely involved in cAMP signaling pathways, neuroactive ligand-receptor interactions, circadian rhythms and other related signaling pathways. qRT-PCR and Western blotting results showed that compared with control group, the expressions of cAMP, PKA and CREB in lung tissue of mice in model group mice were significantly reduced ($P < 0.01$), while the expression of VEGF was significantly increased ($P < 0.01$); Compared with model group, Xiaoqinglong Decoction high-dose group significantly increased the expressions of cAMP, PKA and CREB in lung tissue of mice ($P < 0.05, 0.01$), and significantly decreased the expression of VEGF ($P < 0.01$). **Conclusion** Xiaoqinglong Decoction could significantly reduce inflammatory cell infiltration in the airways of COPD mice, alleviate lung airway remodeling, and treat COPD by regulating cAMP signaling pathway.

Key words: Xiaoqinglong Decoction; chronic obstructive pulmonary disease; transcriptomics; cyclic adenosine monophosphate signaling pathway; vascular endothelial growth factor; inflammatory factors; ephedrine; cinnamaldehyde

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是以慢性气道炎症、肺气肿伴持续性气流受限为主要特征的疾病^[1]。近年来呈现高患病率和致死率,严重影响人类的生命及生活质量,成为全球第3大死亡原因和第4大经济负担疾病,严重威胁着人类健康^{[2][3]}。COPD的发病机制复杂,涉及多种细胞内信号通路的紊乱,主要机制包括氧化应激、蛋白酶失衡、气道炎症之间的相互作用^[4]。气道与肺血管的重塑过程在COPD的进展中扮演着关键角色,是引发COPD患者气流受限及肺功能减退的主要因素^[5]。

当前,支气管扩张剂及吸入型糖皮质激素是治疗COPD的常用药物,主要通过舒张支气管平滑肌、改善气流受限、缓解气道炎症,进而起到治疗作用。然而,长期使用这些药物可能会带来严重的不良反应,如吸入型糖皮质激素会导致患者患肺炎、结核和骨质疏松症的风险增加^[6-7]。传统中药作为中华民族的文化瑰宝,在COPD的治疗中展现出独特的优势,中医治疗可以弥补化学药治疗COPD的不足,特别是在减少药物不良反应、提高治疗效果和改善患者整体生活质量方面^[8]。小青龙汤由东汉时期的著名医家张仲景所创立,并首次记录在《伤寒论》中,其主要功效在于辛温发散以解除表邪、宣通肺气驱散寒邪、温暖肺脏并化解痰饮,常用于呼吸系统疾病的治疗。目前已被证实其可以有效改善

COPD患者的肺功能,显著减少支气管炎性细胞浸润及肺部气道重塑^[9-11]。然而,小青龙汤治疗COPD的具体作用机制尚不清楚。本研究采用转录组学技术并结合动物实验进行验证,对小鼠肺组织进行高通量测序和差异基因表达分析,旨在识别出参与治疗过程的关键途径和基因,为揭示小青龙汤治疗COPD的分子机制提供新的视角和线索。

1 材料

1.1 动物

48只SPF级雄性C57BL/6小鼠,6周龄,购自SPF(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0010,实验动物质量合格证号No.110324231106021536。动物饲养于甘肃中医药大学SPF级科研实验中心,温度(23±2)℃、相对湿度45%~55%、交替光/暗循环12h,自由进食饮水。动物实验经甘肃中医药大学伦理委员会批准(批准号2023-958)。

1.2 药材

药材饮片麻黄(批号23122603)、白芍(批号20240604)、炙甘草(批号20240701)、五味子(批号20240201)、细辛(批号2305007)、桂枝(批号2402009)、干姜(批号23122601)、姜半夏(批号D2407071)均购自甘肃中医药大学附属医院中药房,经甘肃中医药大学药学院何春丽副教授鉴定分别为麻黄科植物中麻黄*Ephedra intermedia* Schrenk et C.

A. Mey. 的干燥草质茎、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根经炙制而成、木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实、马兜铃科植物北细 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 的干燥根、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎、天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的块茎经炮制而成。

1.3 药品与试剂

醋酸地塞米松片（国药准字 H33020822，批号 LB22210）购自浙江仙琚制药股份有限公司；硬蓝兰州香烟（批号 5012250607571504，含焦油量 8 mg、烟气烟碱量 0.8 mg、烟气一氧化碳量 10 mg）购自甘肃烟草工业有限责任公司；脂多糖（lipopolysaccharide, LPS，批号 L8880）购自北京索莱宝生物科技有限公司；0.9%氯化钠注射液（批号 N23022308）购自四川科伦药业股份有限公司；白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）、IL-6、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）、IL-8 ELISA 试剂盒（批号分别为 ED-20174、ED-20188、ED-20852、ED-23314）购自厦门仑昌硕生物科技有限公司；qRT-PCR 试剂盒（批号 BL697）购自北京兰杰柯科技有限公司；环磷腺苷（cyclic adenosine monophosphate, cAMP）抗体（批号 AB134901）购自英国 Abcam 公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）、蛋白激酶 A（protein kinase A, PKA）、环磷腺苷效应组件结合蛋白（cAMP-response element binding protein, CREB）、血管内皮生长因子 A（vascular endothelial growth factor receptor A, VEGFA）抗体（批号分别为 M20006S、T58000、T55426、TA5131）购自上海艾比玛特医药科技有限公司；HRP 标记的二抗山羊抗兔 IgG 抗体（批号 3837A26）购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.4 仪器

WPBPLT-UNR-RT-2 型动物肺功能测试系统（法国 EMKA 公司）；H1750 台式高速离心机（湘仪离心机仪器有限公司）；Tissuelyser-48 型高通量冷冻组织研磨器（上海净信实业发展有限公司）；NIKONDS-U3 型凝胶成像分析系统（日本 Nikon 公司）；XSPC204 型显微镜（法国 CIC 公司）；KH30R

型高速低温离心机（湖南凯达科学仪器有限公司）；CFX96 型 qRT-PCR 仪、PowerPacBasic 型电泳转膜系统（美国伯乐公司）；BX43+SC50 型显微拍照系统（日本奥林巴斯有限公司）；DMJA203P 型电子天平（上海达姆实业有限公司）。

2 方法

2.1 小青龙汤的制备

小青龙汤由麻黄 9 g、白芍 9 g、炙甘草 6 g、五味子 3 g、细辛 3 g、桂枝 6 g、干姜 3 g、姜半夏 9 g 组成，按处方配比称取各药材，加水浸泡 1 h。第一次加 10 倍量的纯净水煎煮，第二次加 8 倍量的纯净水煎煮，每次 1 h，合并药液并滤去药渣，随后置于旋转蒸发仪中，按给药剂量浓缩至 2 g/mL，于 4 °C 冰箱保存备用。小青龙汤中麻黄、桂枝为君药，其主要药效成分分别为麻黄碱及桂皮醛，根据《中国药典》2020 年版一部方法，测得麻黄碱、桂皮醛质量分数分别为 0.91%、1.73%。

2.2 分组、造模与给药

按照随机数字表法将小鼠分为对照组、模型组、地塞米松（1 mg/kg）组和小青龙汤低、中、高剂量（1.46、0.73、0.36 g/kg，分别相当于人等效剂量的 2、1、0.5 倍）组，每组 8 只。除对照组外，其余各组小鼠参考文献方法^[12-16]构建 COPD 模型。采用自制负压吸引装置制备烟草提取物，实验前进行气密性检测。将 2 支去滤嘴香烟连接负压吸引装置，将香烟烟雾收集于装有 4 mL LPS 溶液（1 g/L）的收集瓶中，待香烟烟雾充分溶解后，所得悬液经 1 mol/L NaOH 溶液调整至 pH 7.4，随后经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过，以有效去除细菌及大颗粒杂质。小鼠 ip 戊巴比妥钠（60 mg/kg）麻醉后，通过鼻腔滴入烟草提取物 30 μ L，对照组小鼠鼻腔滴入等体积的生理盐水，5 次/周，持续造模 4 周。小鼠禁食 12 h，随机取对照组 2 只、造模组 4 只小鼠检测肺功能，处死后进行肺组织病理学观察，进行模型评价。模型构建成功后，自第 29 天起各给药组 ig 相应药物（10 mL/kg），对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水，1 次/d，持续给药 4 周。

2.3 小鼠一般状态观察

实验过程中，观察各组小鼠的精神状态、进食量、活动频次、对外界刺激的敏感程度、皮毛状态及饮食状况，同时注意观察小鼠是否出现咳嗽、气喘现象，以及鼻部和呼吸道是否有分泌物等症状。每周称定小鼠体质量，比较各组小鼠造模及给药期

间的体质量变化。

2.4 肺功能检测

末次给药后小鼠禁食 12 h, 采用动物肺功能测试系统测量各组小鼠肺功能流速指标[吸气气流高峰流速 (peak inspiratory flow, PIF)、呼气气流高峰流速 (peak expiratory flow, PEF)]和容量指标[吸气容积 (tidal volume, TV)、呼气容积 (electric vehicle, EV)、每分钟通气量 (minute volume, MV)]。

2.5 ELISA 测定血清中 IL-6、IL-8、TNF- α 和 IL-1 β 水平

小鼠吸入异氟烷麻醉后仰卧固定, 剪去胸前区域被毛, 以碘酒及 75%乙醇消毒胸前区域, 于胸左侧心搏最强处穿刺采血。血液样本静置 1 h 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清。按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 IL-6、IL-8、TNF- α 和 IL-1 β 水平。

2.6 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肺组织病理变化

采血完成后, 对小鼠实施安乐死, 迅速取出右肺组织于 -80 °C 冰箱保存, 取出左肺组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 修块、乙醇脱水、石蜡包埋后切片 (厚 4.0 μ m), 经脱蜡、复水、苏木素染色、返蓝, 再以伊红染色、脱水、透明、中性树胶封固, 于显微镜下观察并拍照。

2.7 转录组测序

随机选取对照组、模型组和小青龙汤高剂量组小鼠各 3 只, 取肺组织进行转录组测序。使用 TRIzol 试剂提取各组小鼠肺组织总 RNA, 并通过 NanoDrop 光谱亮度计测定 RNA 的纯度和浓度 (A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0), Qubit 定量仪精确定量 RNA 总量 (≥ 500 ng)。利用 Illumina 兼容的文库构建试剂盒构建测序文库, 并在 IlluminaNovaSeq6000 平台上进行双端高通量测序。使用 Skewer 软件 (v0.2.2) 对测序数据执行从 3'端开始的动态修剪, 以去除接头序列片段及低质量片段。利用 FastQC 软件 (v0.11.5) 对预处理后的数据进行全面的质量评估, 以 $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC) $| > 1$ 、 $P < 0.05$ 为筛选条件, 筛选差异表达基因。为了直观展示差异表达基因, 使用 R 语言中的 ggplots2 包绘制火山图和 MA 图, 利用 R 包 ClusterProfiler 对筛选出的差异基因集进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

2.8 qRT-PCR 检测肺组织 cAMP、PKA、CREB、VEGF mRNA 表达

取各组小鼠右肺组织样本 100 mg, 加入 1 mL TRIzol 试剂, 按照试剂盒说明书提取肺组织中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
cAMP	F: GGGGTAGTGAAGCAGTGTATGGG R: CTCTATTTTCAGGTGCAAGTTTCTGG
PKA	F: GTTTACCCGGCCAACGACT R: GGGCGATGAATTTGTGGTCTT
CREB	F: AGCAGCTCATGCAACATCATC R: AGTCCTTACAGGAAGACTGAACT
VEGF	F: GCACATAGAGAGAATGAGCTTCC R: CTCCGCTCTGAACAAGGCT

2.9 Western blotting 检测肺组织 cAMP、CREB、p-CREB、PKA、p-PKA、VEGFA 蛋白表达

取各组小鼠右肺组织样本 100 mg, 加入组织裂解液, 经过剪碎、匀浆处理后, 采用高速冷离心方法分离获取上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 室温避光封闭 2 h。分别加入相应一抗 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜; TBST 溶液洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h。TBST 溶液洗膜 3 次后, 加入 ECL 发光试剂显影并曝光, 通过 QuantityOne 图像分析软件对条带进行扫描分析, 利用 Image J 软件对数据进行进一步统计分析。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件对计量资料进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。在进行多组间比较前, 先进行方差齐性检验, 若方差齐则采用 LSD 方法进行各组间的两两比较, 若方差不齐则选择 Tamhane's T2 方法进行对比。

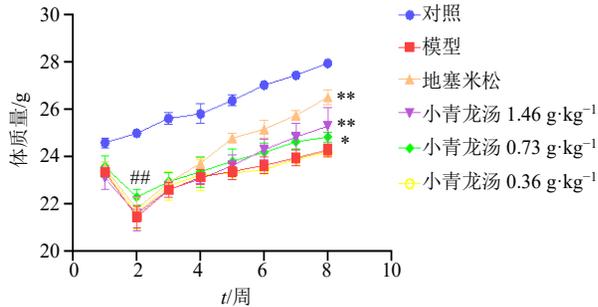
3 结果

3.1 小青龙汤对 COPD 小鼠一般状态的影响

实验过程中, 对照组小鼠反应灵敏, 呼吸正常, 毛发黑亮、浓密且富有光泽, 活动状况佳。小鼠造模 15 d 后可以观察到模拟人类 COPD 特征的一系列临床表现, 包括呼吸频率增快、呼吸困难, 尤其在体力活动后更为显著, 体质量下降、皮毛失去光

泽且粗糙、活动能力下降、反应迟钝、呼吸音增粗、流浅黄色浓稠鼻涕、口腔分泌物增多。给予药物干预4周后,小青龙汤高剂量组和地塞米松组小鼠体重质量均有不同程度的升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 , 图1),毛色略有光泽,咳、喘减轻甚至消失。

实验过程中,对照组小鼠死亡1只,地塞米松组小鼠死亡1只,小青龙汤低剂量组小鼠死亡1只。小鼠可能因争夺资源、压力或体弱而打斗致死,在



与对照组比较: ### $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图1 小青龙汤对 COPD 小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)
Fig. 1 Effect of Xiaoqinglong Decoction on body weight of COPD mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

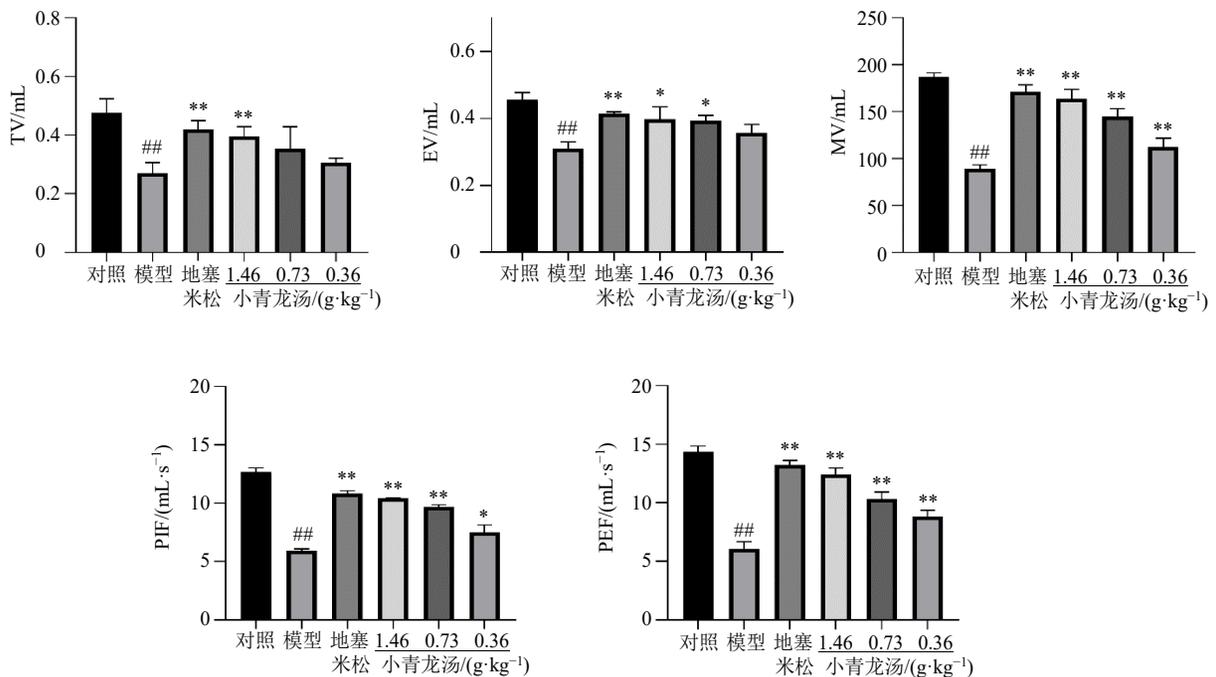


图2 小青龙汤对 COPD 小鼠肺功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 2 Effect of Xiaoqinglong Decoction on lung function indicators in COPD mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

设计方案时考虑到可能发生意外死亡,所以每组样本量为8只;同时,课题组也对死亡小鼠对结果的影响进行了分析,对照组、地塞米松组和小青龙汤低剂量组每组7只对本研究结果无明显影响。

3.2 小青龙汤对 COPD 小鼠肺功能指标的影响

如图2所示,与对照组比较,模型组小鼠肺功能流速指标(PIF、PEF)和容量指标(TV、EV、MV)均显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠 PIF、PEF 和 MV 均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),地塞米松组和小青龙汤中、高剂量组小鼠 EV 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),地塞米松组和小青龙汤高剂量组小鼠 TV 显著升高 ($P < 0.01$)。

3.3 小青龙汤对 COPD 小鼠肺组织病理变化的影响

如图3所示,对照组小鼠肺组织结构清晰,仅在局部区域观察到肺泡壁有轻微的增厚现象,而未见有明显的炎性细胞浸润。模型组小鼠肺组织表现出肺泡壁显著增宽、肺泡大小不均一的情况,同时在血管及细支气管周围可见大量淋巴细胞浸润,细支气管出现扩张并伴有出血,管腔内部还可见到少量的黏液及上皮样细胞。给予药物干预后,以上病理状况均得到了不同程度的缓解。其中,小青龙汤高剂量组和地塞米松组病理改善情况最为明显。

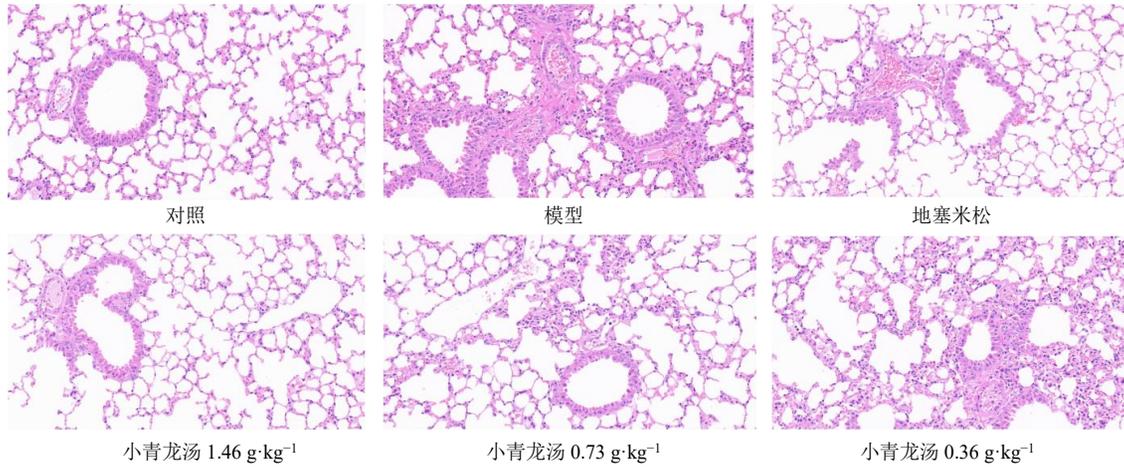


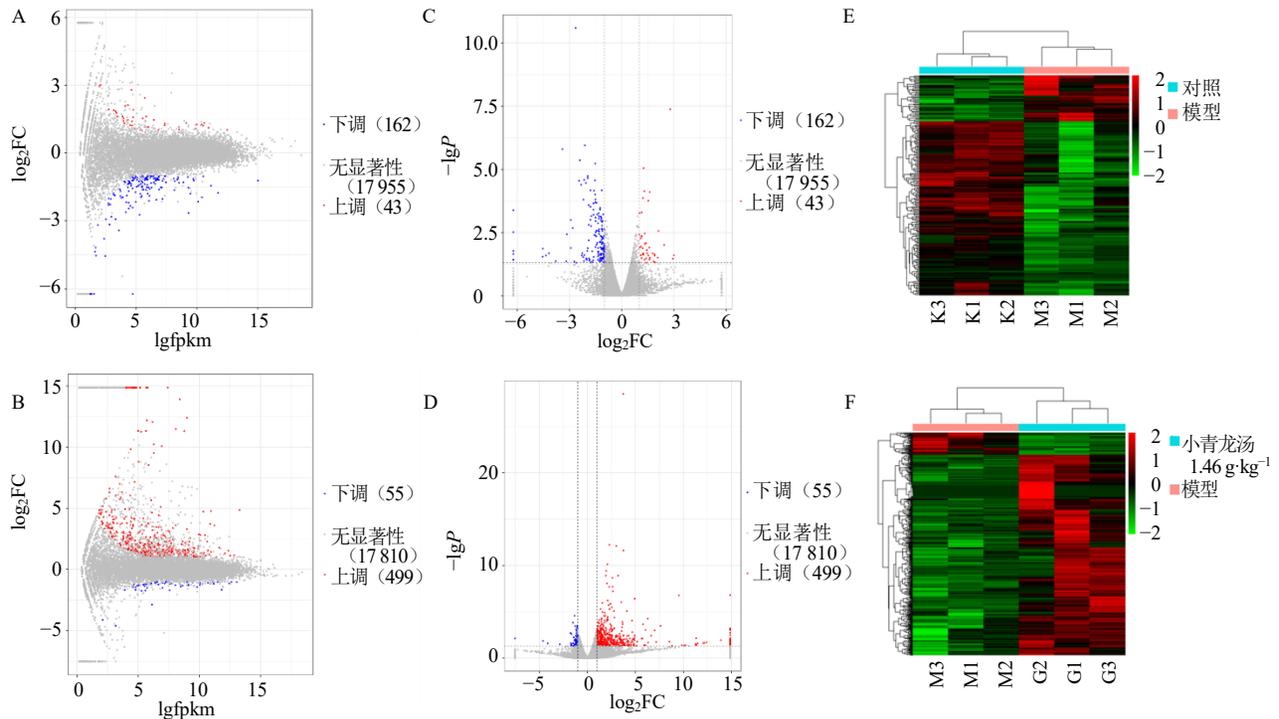
图 3 小青龙汤对 COPD 小鼠肺组织病理变化的影响 (HE, ×40)

Fig. 3 Effect of Xiaoqinglong Decoction on pathological changes in lung tissue of COPD mice (HE, × 40)

3.4 各组小鼠肺组织差异表达基因分析

如图 4-A、C 所示, 与对照组比较, 模型组共筛选出 205 个差异表达基因, 其中 43 个上调基因、162 个下调基因。如图 4-B、D 所示, 与模型组比较, 小青龙汤高剂量组共筛选出 554 个差异基因, 其中 499

个上调基因、55 个下调基因。对照组 vs 模型组、模型组 vs 小青龙汤高剂量组差异表达基因进行聚类分析, 获得聚类分析热图 (图 4-E、F), 结果显示, 对照组 vs 模型组、模型组 vs 小青龙汤高剂量组基因表达差异显著, 各组间可以得到较好的区分。



A-对照组 vs 模型组 MA 图; B-模型组 vs 小青龙汤高剂量组 MA 图; C-对照组 vs 模型组火山图; D-模型组 vs 小青龙汤高剂量组火山图; E-对照组 vs 模型组的差异基因聚类图; F-模型组 vs 小青龙汤高剂量组的差异表达基因聚类图。

A-control group vs model group MA plot; B-model group vs Xiaoqinglong Decoction high-dose group MA plot; C-control group vs model group volcano plot; D-model group vs Xiaoqinglong Decoction high-dose group volcano plot; E-differential expressed gene clustering map of control group vs model group; F-differential expressed gene clustering map of model group vs Xiaoqinglong Decoction high-dose group.

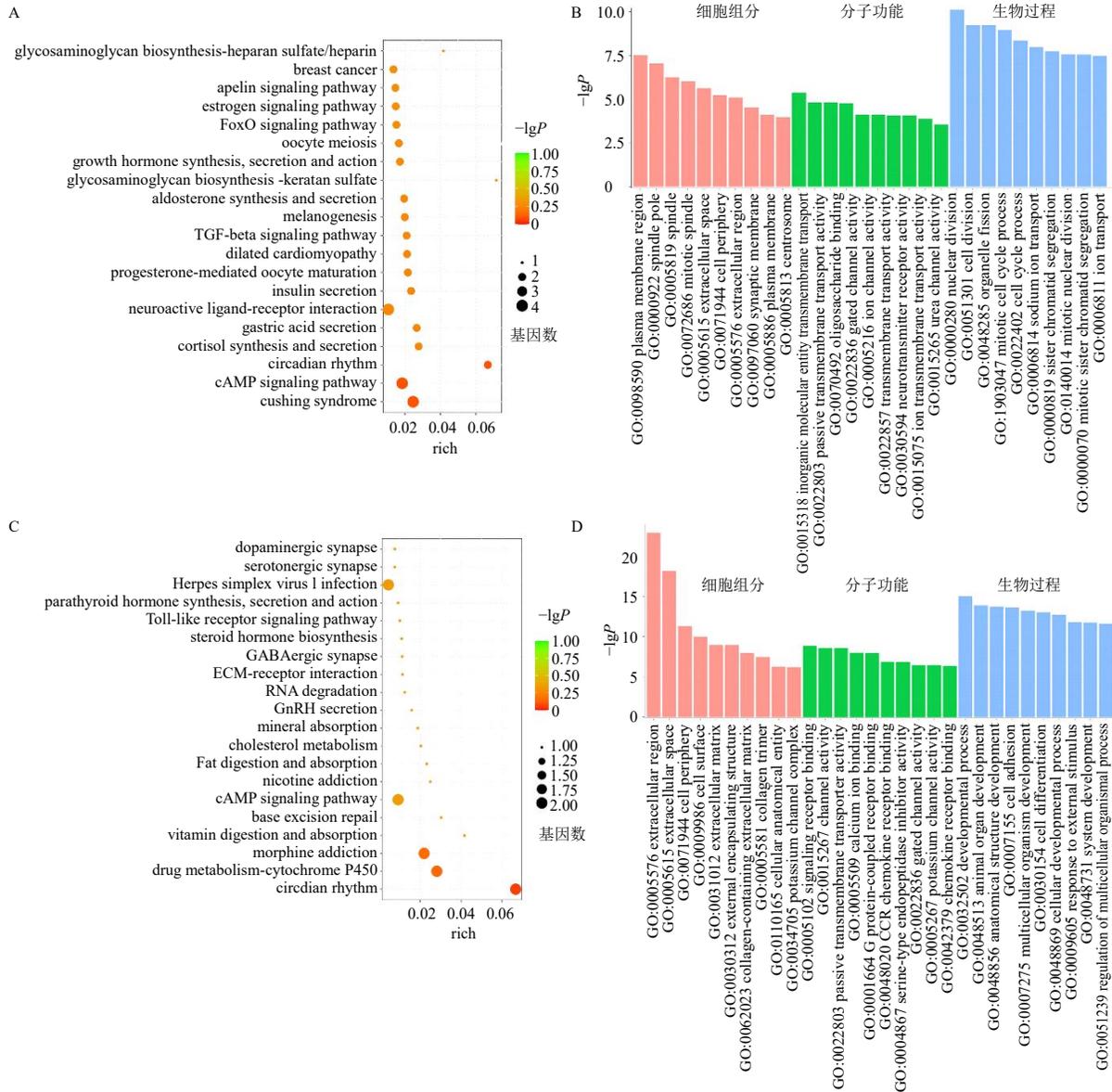
图 4 各组小鼠肺组织差异表达基因分析

Fig. 4 Differential expressed gene analysis in lung tissue of mice in each group

3.5 各组小鼠肺组织差异表达基因的富集分析

如图 5-A、B 所示，模型组 vs 对照组的差异表达基因主要涉及 cAMP 信号通路、神经活性配体-受体相互作用、昼夜节律、库欣综合征等相关信号通路，细胞组分主要涉及质膜区域、纺锤体、细胞空间、细胞周边等，分子功能主要涉及离子通道活性、跨膜转运蛋白活性、神经递质受体活性、门控通道活性等，生物过程主要涉及核分裂、细胞分裂、细胞器裂

变等。如图 5-C、D 所示，模型组 vs 小青龙汤高剂量组的差异表达基因主要涉及 cAMP 信号通路、药物代谢-细胞色素 P450、昼夜节律、类固醇激素生物合成等相关信号通路，细胞组分主要涉及细胞外区域、细胞周边、细胞外基质、信号受体结合等，分子功能主要涉及信号受体结合、钙离子结合、G 蛋白偶联受体结合、CCR 趋化因子受体结合等，生物过程主要涉及器官发育、细胞黏附、细胞分化等。



A-对照组 vs 模型组交集靶基因 KEGG 富集分析气泡图；B-对照组 vs 模型组交集靶基因 GO 富集分析柱状图；C-模型组 vs 小青龙汤高剂量组交集靶基因 KEGG 富集分析气泡图；D-模型组 vs 小青龙汤高剂量组交集靶基因 GO 富集分析柱状图。

A-bubble chart of KEGG enrichment analysis for intersection target genes between control group and model group; B-bar chart of GO enrichment analysis for intersection target genes between control group and model group; C-bubble chart of KEGG enrichment analysis for intersection target genes between model group and Xiaoqinglong Decoction high-dose group; D-bar chart of GO enrichment analysis for intersection target genes between model group and Xiaoqinglong Decoction high-dose group.

图 5 各组小鼠肺组织差异表达基因的富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis of differentially expressed genes in lung tissue of mice in each group

3.6 小青龙汤对 COPD 小鼠血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地塞米松和小青龙汤高剂量组小鼠血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.01$), 小青龙汤中剂量组小鼠血清中 IL-6、IL-8 和 IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.7 小青龙汤对 COPD 小鼠肺组织 cAMP、PKA、CREB、VEGF mRNA 表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 cAMP、PKA、CREB mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), VEGF mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地塞米松和小青龙汤高剂量组小鼠肺组织中 cAMP、PKA、CREB mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 小青龙汤中剂量组小鼠肺

组织中 cAMP、CREB mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 小青龙汤低剂量组小鼠肺组织中 CREB mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 各给药组小鼠肺组织中 VEGF mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.8 小青龙汤对 COPD 小鼠肺组织 cAMP、PKA、CREB、VEGFA 蛋白表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 cAMP、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), VEGFA 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地塞米松和小青龙汤中、高剂量组小鼠肺组织中 cAMP、p-CREB/CREB 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 地塞米松和小青龙汤高剂量组小鼠肺组织中 p-PKA/PKA 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 各给药组小鼠肺组织中 VEGFA 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

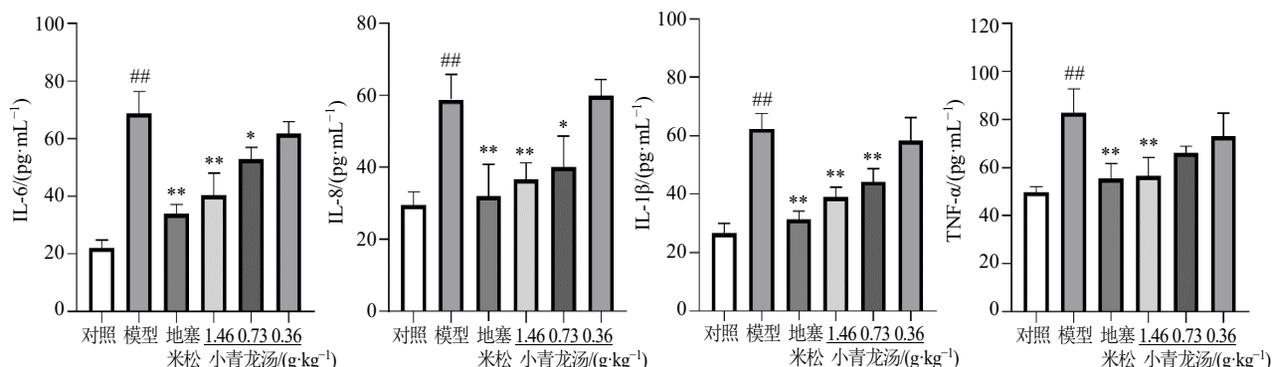


图 6 小青龙汤对 COPD 小鼠血清中 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 6 Effect of Xiaoqinglong Decoction on levels of IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α in serum of COPD mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

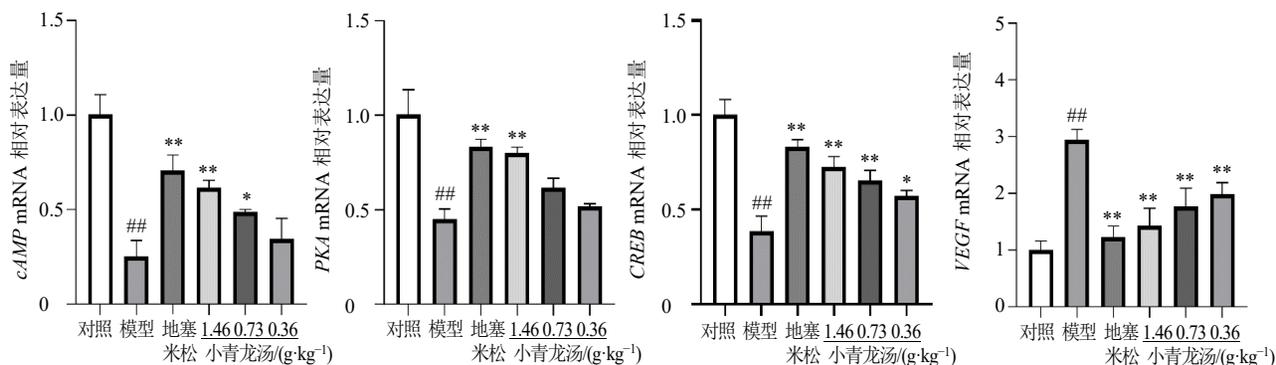


图 7 小青龙汤对 COPD 小鼠肺组织 cAMP、PKA、CREB、VEGF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 7 Effect of Xiaoqinglong Decoction on mRNA expressions of cAMP, PKA, CREB and VEGF in lung tissue of COPD mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

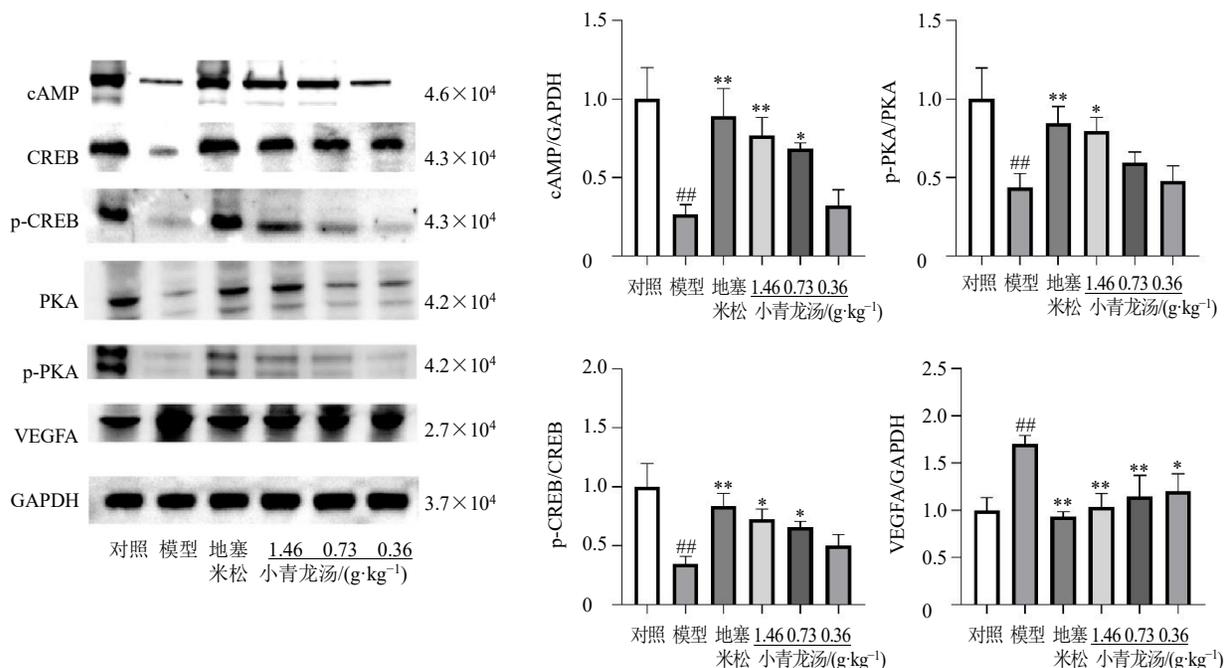


图 8 小青龙汤对 COPD 小鼠肺组织 cAMP、PKA、CREB、VEGFA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 8 Effect of Xiaoqinglong Decoction on protein expressions of cAMP, PKA, CREB and VEGF in lung tissue of COPD mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

4 讨论

中医理论认为 COPD 是由多种因素引起的复杂病理状态,归类于“咳嗽”“喘证”“肺胀”“痰饮”等范畴^[17]。COPD 的发病原因主要归结为肺脾肾三脏功能失调,导致气道黏液高分泌,形成痰湿水饮,阻塞气道,进而引起气流受限。在中医理论中,肺主气,脾主运化水湿,肾主水,三脏功能失调导致水液代谢失常,痰湿内生,阻塞气道,形成 COPD 的主要病理基础^[17]。此外,外邪侵袭如风寒湿邪,也是诱发和加重 COPD 的重要因素,外邪侵袭肺卫,肺失宣降,导致气道阻塞,痰湿内停,从而引发或加重 COPD 的临床症状^[18-20]。目前,西医治疗 COPD 以抗感染、化痰平喘联合应用为主,但效果有限,且难以预防气道重塑,忽略了患者体质变化特点。外寒内饮,在外当以解表散寒,在内当遵张仲景之法,以温药和之^[21]。小青龙汤作为中医治疗外寒内饮型喘病的代表方,具有温阳散寒、宣肺平喘的功效,其主要药味如炙麻黄、桂枝、白芍、干姜、制半夏、五味子、细辛等均具有温肺散寒、化痰降逆的功效。炙麻黄宣肺平喘,桂枝温阳解表,白芍和营养血,干姜温中散寒,制半夏燥湿化痰,五味子收敛肺气,细辛温经散寒,以上药味协同作用,能够有效温化寒痰、平喘止咳,通过通调水道、健

脾利湿、温阳利水,达到标本兼治的效果^[17,22]。

COPD 是一种主要由吸烟引起的进行性肺部疾病,其特征是慢性炎症和不可逆的持续性气流受限,气道重塑是 COPD 的关键病理特征之一。cAMP 是调节细胞信号转导的“第二信使”,在调节细胞内复杂反应信号传导发挥着重要作用。研究表明,通过提高细胞内 cAMP 水平,可抑制炎症、增强平滑肌松弛,进而防治 COPD^[23-27]。同时,VEGF 作为一种重要的血管内皮生长因子,与 COPD 中的血管重塑和气道炎症密切相关^[28-29]。因此,本研究通过建立 COPD 小鼠模型,观察小青龙汤对模型小鼠的治疗效果,并结合转录组学技术探讨其作用机制。

本研究结果显示,小青龙汤能够显著改善 COPD 小鼠的一般状态和肺组织病理损伤,减少气道炎症细胞浸润、减轻肺部气道重塑,其作用机制可能与调节 cAMP 信号通路相关蛋白及基因的表达有关。差异表达基因筛选结果显示,昼夜节律核心调控基因周期蛋白 2 (period circadian regulator 2, Per2) 和白蛋白 D-盒结合蛋白 (albumin D-box binding protein, Dbp) 的表达显著发生变化,这些基因在昼夜节律的调节中扮演着重要的角色^[30-31]。而昼夜节律失调与 COPD 发病机制密切相关,影响炎症反应和气道功能。Per2 通过磷酸二酯酶 4

(phosphodiesterase, PDE4) 调控 cAMP 信号通路活性, Dbp 作为转录因子结合 CRE 协同调节下游靶基因表达^[32-34]。提示小青龙汤可能通过调控昼夜节律核心基因网络及其下游 cAMP 信号通路活性, 改善 COPD 患者夜间症状加重和肺功能昼夜波动现象。同时, 筛选出的主要差异表达基因蛋白酪氨酸激酶 6 (protein tyrosine kinase 6, PTK6) 也可能通过磷酸化调控 cAMP 直接激活的交换蛋白 (exchange protein directly activated by cAMP, Epac) 的活性, 从而激活下游 Ras 相关蛋白 1 (ras-related protein 1, Rap1) 信号通路, 进而诱导气道平滑肌舒张^[35-38]。KEGG 通路富集分析证实, cAMP 信号通路是小青龙汤干预 COPD 的核心靶标。小青龙汤可显著上调 COPD 小鼠肺组织中 cAMP 表达, 通过激活 PKA 促进囊性纤维化跨膜传导调节因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) 的磷酸化, 从而改善黏液纤毛清除功能, 与 Zhang 等^[32]在 COPD 大鼠模型中的研究结果一致。KEGG 通路富集分析显示, 除 cAMP 信号通路外, 差异表达基因还涉及药物代谢-细胞色素 P450、昼夜节律、吗啡成瘾、类固醇激素生物合成等相关信号通路。细胞色素 P450 在药物代谢中起着重要作用, 小青龙汤可能通过调节细胞色素 P450 的活性, 影响药物代谢, 从而增强其治疗效果。类固醇激素在抗炎和免疫调节中发挥重要作用, 小青龙汤可能通过调节类固醇激素生物合成相关信号通路, 间接影响 cAMP 信号通路, 从而增强其治疗效果^[39-40]。综上, 小青龙汤可能通过调节 cAMP 信号通路, 改善 COPD 症状; 同时, 小青龙汤通过调节药物代谢 (细胞色素 P450)、昼夜节律、类固醇激素生物合成等相关信号通路等, 间接影响 cAMP 信号通路, 增强其治疗效果。

cAMP-PKA-CREB 通路是一个重要的细胞信号传导途径, 在多种生理和病理过程中发挥作用^[41-42]。cAMP 通过激活 PKA 及其下游效应因子如 CREB 来调节多种靶基因的转录, 这一信号通路的激活可抑制炎症和增强平滑肌松弛、缓解气道重塑及支气管扩张^[40]。本研究检测了小鼠肺组织 cAMP、PKA、p-PKA、CREB、p-CREB 的表达, 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中以上指标的表达均明显降低; 给予药物干预后, 上述指标的表达均不同程度地升高。表明 cAMP-PKA-CREB 信号通路在 COPD 的发生发展中起着重要的作用, 小青龙汤可

激活 cAMP-PKA-CREB 信号通路, 从而治疗 COPD。

同时, COPD 的发生和发展与气道重塑也有着密不可分的关系, COPD 涉及气道结构的长期变化包括气道壁增厚、炎症细胞浸润、胶原蛋白沉积和腺体增生等, 这些变化导致气道阻塞和气流受限, 是 COPD 病理特征之一^[43]。VEGF 是一类具有不同表达模式和生物学功能的蛋白质家族成员, 包括 VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD 和胎盘生长因子 (placental growth factor, PLGF), VEGF 是一种可溶性的肝素结合糖蛋白, 通过与胎盘生长因子受体 1 (fms-like tyrosine kinase 1, Flt-1) 和胎盘生长因子受体 2 (fetal liver kinase 1, Flk-1) 结合, 参与内皮细胞的增殖、迁移和存活^[44]。VEGF 在多种病理状态下具有重要的生物学作用, 在哮喘和 COPD 的血管重塑中起着关键作用, 它能够促进血管生成、增加血管通透性, 且当 VEGF 过度表达时可导致气道壁的炎症细胞浸润和结构破坏, 进而促进气道重塑^[45-46]。本研究结果显示, 模型组小鼠肺组织中 VEGF 表达较对照组显著升高, 给予药物干预后 VEGF 表达均有不同程度的降低, 提示 VEGF 可通过调控气道的重塑重构进而影响 COPD 进程。

综上, 本研究通过转录组测序分析 COPD 模型小鼠中小青龙汤给药前后差异表达基因情况, 并通过体内实验进一步验证, 发现 cAMP 通路在小青龙汤治疗 COPD 中发挥着重要作用。本研究为小青龙汤在 COPD 治疗中的应用提供了新的分子机制解释, 并且为未来的研究提供了新的方向。然而, 本研究仍存在一些局限性。本研究主要集中在小青龙汤对 COPD 小鼠模型的短期治疗效果上, 对于其长期治疗效果和剂量相关性的研究尚不充分。转录组学分析虽然揭示了小青龙汤可能的作用机制, 但仍需要进一步的实验验证, 包括对关键信号通路和靶点的深入研究。此外, 中药复方的作用机制往往涉及多途径和多靶点, 小青龙汤对 COPD 的治疗作用可能还涉及其他机制。未来的研究将致力于以下 4 个方面: 一是进一步验证小青龙汤对 COPD 的长期治疗效果; 二是深入探讨小青龙汤对 COPD 相关信号通路的影响, 特别是 cAMP 信号通路和 VEGF 相关的血管生成过程; 三是利用体外细胞实验和临床样本, 进一步验证小青龙汤的作用机制; 四是探索小青龙汤与其他药物的联合治疗潜力, 以期为 COPD 的治疗提供更多的策略和选择。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Vogelmeier C F, Criner G J, Martinez F J, *et al.* Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report: GOLD executive summary [J]. *Respirology*, 2017, 22(3): 575-601.
- [2] Upadhyay P, Wu C W, Pham A, *et al.* Animal models and mechanisms of tobacco smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2023, 26(5): 275-305.
- [3] Safiri S, Carson-Chahhoud K, Noori M, *et al.* Burden of chronic obstructive pulmonary disease and its attributable risk factors in 204 countries and territories, 1990—2019: Results from the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *BMJ*, 2022, 378: e069679.
- [4] Madison M C, Margaroli C, Genschmer K R, *et al.* Protease-armed, pathogenic extracellular vesicles link smoking and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2023, 208(10): 1115-1125.
- [5] Kovacs L, Su Y C. Redox-dependent calpain signaling in airway and pulmonary vascular remodeling in COPD [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 967: 139-160.
- [6] Yawn B P, Mintz M L, Doherty D E. GOLD in practice: Chronic obstructive pulmonary disease treatment and management in the primary care setting [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16: 289-299.
- [7] Alharbi M G, Kalra H S, Suri M, *et al.* Pulmonary rehabilitation in management of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Cureus*, 2021, 13(10): e18414.
- [8] 廖丽君, 张鹏飞, 陈斯宁. 中医特色疗法治疗 COPD 稳定期研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(7): 175-178.
- [9] Gao Z, Jing J, Liu Y Y. Xiaoqinglong Decoction (a traditional Chinese medicine) combined conventional treatment for acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Medicine*, 2020, 99(14): e19571.
- [10] Wang S D, Lin L J, Chen C L, *et al.* Xiao-Qing-Long-Tang attenuates allergic airway inflammation and remodeling in repetitive *Dermatogoides pteronyssinus* challenged chronic asthmatic mice model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(2): 531-538.
- [11] Chen Z F, Zhou Y L, Tan Y F, *et al.* Network pharmacology analysis and experimental validation of Xiao-Qing-Long-Tang's therapeutic effects against neutrophilic asthma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, 243: 116063.
- [12] 梁小波, 吴德洪, 王星, 等. 鼻内滴注烟草提取物和脂多糖建立慢性阻塞性肺疾病小鼠模型的评价 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2019, 45(6): 1454-1458.
- [13] Cheng Q M, Fang L J, Feng D D, *et al.* Memantine ameliorates pulmonary inflammation in a mice model of COPD induced by cigarette smoke combined with LPS [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2005-2013.
- [14] Wang L, Pelgrim C E, Peralta Marzal L N, *et al.* Changes in intestinal homeostasis and immunity in a cigarette smoke- and LPS-induced murine model for COPD: The lung-gut axis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2022, 323(3): L266-L280.
- [15] Chen J L, Yang X, Zhang W Y, *et al.* Therapeutic effects of resveratrol in a mouse model of LPS and cigarette smoke-induced COPD [J]. *Inflammation*, 2016, 39(6): 1949-1959.
- [16] Shu J Z, Li D F, Ouyang H P, *et al.* Comparison and evaluation of two different methods to establish the cigarette smoke exposure mouse model of COPD [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15454.
- [17] 刘宏祥, 赵永辰, 王涛, 等. 从三焦水运失司论治慢性阻塞性肺疾病 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 955-957.
- [18] 张美萃, 杜世拔, 范良. 小青龙汤联合常规治疗对外寒内饮型慢性阻塞性肺疾病急性期患者的临床疗效 [J]. 中成药, 2022, 44(1): 78-82.
- [19] 李建生. 国际中医临床实践指南·慢性阻塞性肺疾病 [J]. 世界中医药, 2020, 15(7): 1084-1092.
- [20] 林子琦, 焦莹莹, 文证, 等. 小青龙汤治疗肺系疾病的现代临床应用进展 [J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(2): 30-33.
- [21] 吴建军, 李欣, 秦阳, 等. 小青龙汤在慢性阻塞性肺疾病中的应用 [J]. 中医杂志, 2016, 57(22): 1925-1928.
- [22] 王兵, 陈虎林, 宋功如. 小青龙汤合九味羌活汤治疗寒湿犯肺型慢性阻塞性肺疾病疗效 [J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(11): 127-130.
- [23] Billington C K, Ojo O O, Penn R B, *et al.* cAMP regulation of airway smooth muscle function [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26(1): 112-120.
- [24] 周亚妮, 李若楠. 杨梅素调节 cAMP/PKA/CREB 信号通路对炎症性肠病大鼠免疫功能的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(11): 1456-1463.
- [25] 周哲旭, 王省, 唐洲, 等. 基于 Rac1 信号通路研究淫羊藿苷对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺泡巨噬细胞胞葬及吞噬功能的影响 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 159-170.
- [26] 徐竞, 杨光明, 李涛, 等. 经 MEGJ 的 cAMP 传递介导 Ang2 调节缺氧大鼠血管平滑肌细胞低反应性 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(1): 41-46.
- [27] 李文宏, 樊学程, 谢金根, 等. 基于含药肝孵育液法的麻黄—杏仁药对舒张支气管平滑肌的 β_2 受体机制与效应成分验证 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(10):

- 1078-1083.
- [28] Lee C G, Link H, Baluk P, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung [J]. *Nat Med*, 2004, 10(10): 1095-1103.
- [29] 周盈, 曹磊, 平芬. 慢性阻塞性肺疾病相关炎性细胞因子的研究进展 [J]. *临床荟萃*, 2020, 35(3): 273-276.
- [30] Zhao Y H, Wu Y N, Wang J, *et al.* Circadian transcription factor Dbp promotes rat calvarial osteoprogenitors osteogenic differentiation through Kiss1/GnRH/E2 signaling pathway loop [J]. *J Cell Biochem*, 2021, 122(2): 166-179.
- [31] Wuarin J, Falvey E, Lavery D, *et al.* The role of the transcriptional activator protein DBP in circadian liver gene expression [J]. *J Cell Sci Suppl*, 1992, 16: 123-127.
- [32] Zhang C Q, Feng L L, Li M, *et al.* Effects of Xiaoqinglong Decoction on gene expression profiles in a rat chronic obstructive pulmonary disease model [J]. *Biosci Trends*, 2012, 6(5): 262-269.
- [33] Zhang Z Y, Yao J Y, Huo J X, *et al.* Action potential-independent spontaneous microdomain Ca^{2+} transients-mediated continuous neurotransmission regulates hyperalgesia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2025, 122(3): e2406741122.
- [34] Brenna A, Ripperger J A, Saro G, *et al.* PER2 mediates CREB-dependent light induction of the clock gene *Per1* [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 21766.
- [35] Aslam M, Tanislav C, Troidl C, *et al.* cAMP controls the restoration of endothelial barrier function after thrombin-induced hyperpermeability via Rac1 activation [J]. *Physiol Rep*, 2014, 2(10): e12175.
- [36] Yang Z K, Kirton H M, Al-Owais M, *et al.* Epac2-Rap1 signaling regulates reactive oxygen species production and susceptibility to cardiac arrhythmias [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(3): 117-132.
- [37] 刘禹翔, 王峰, 曲敬来, 等. 小青龙汤对慢性阻塞性肺疾病急性发作期患者细胞因子及肺功能的影响 [J]. *新中医*, 2013, 45(7): 24-26.
- [38] 罗新越, 王慧贤, 徐盼, 等. 基于 cAMP 信号通路探讨小青龙汤对 CFTR 离子通道调节哮喘黏液纤毛清除功能的作用机制 [J]. *新中医*, 2024, 56(14): 14-19.
- [39] 韩东卫, 杨琴琴, 王利芳, 等. 基于整合药理学及分子对接技术探讨小青龙汤治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期的分子机制 [J]. *中国医药导报*, 2022, 19(10): 20-24.
- [40] 梁亚萍, 王略力, 黄蓉, 等. 调控 cAMP 通路防治慢性阻塞性肺疾病的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(12): 1773-1777.
- [41] Zhang H Y, Kong Q B, Wang J, *et al.* Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2020, 9(1): 32.
- [42] Chan S M H, Selemidis S, Bozinovski S, *et al.* Pathobiological mechanisms underlying metabolic syndrome (MetS) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Clinical significance and therapeutic strategies [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 198: 160-188.
- [43] Lin H C, Cheng S, Yang S Y, *et al.* Isoforskolin modulates AQP4-SPP1-PIK3C3 related pathway for chronic obstructive pulmonary disease via cAMP signaling [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 128.
- [44] Chis A F, Răjnoveanu R M, Man M A, *et al.* Increased vascular endothelial growth factor serum level and the role of +936C/T gene polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Medicina*, 2021, 57(12): 1351.
- [45] Bakakos P, Patentalakis G, Papi A. Vascular biomarkers in asthma and COPD [J]. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16(14): 1599-1609.
- [46] Papaioannou A I, Kostikas K, Kollia P, *et al.* Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: Friend or foe? [J]. *Respir Res*, 2006, 7(1): 128.

[责任编辑 李亚楠]