

通心络联合外周血间充质干细胞移植对糖尿病足大鼠血管新生磷脂酰肌醇 3 - 激酶 / 蛋白激酶 B 信号通路的影响研究

郭勇英, 位庚, 李红蓉, 田超, 张军芳, 高怀林

【摘要】 目的 探讨通心络联合外周血间充质干细胞移植对糖尿病足大鼠血管新生磷脂酰肌醇 3 - 激酶 / 蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路的影响。方法 于 2014 年 3 月, 选取无特定病原体 (SPF 级) 雄性 SD 大鼠 70 只, 10 只为对照组; 60 只制作糖尿病足大鼠模型, 然后随机分为模型组、西洛他唑组、通心络组、外周血间充质干细胞移植组、西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组、通心络 + 外周血间充质干细胞移植组各 10 只。完成相应实验操作 28 d 后, 检测并比较各组大鼠的外周血间充质干细胞及缺血下肢肌组织中的内皮糖蛋白 (CD)₁₀₅、细胞周期蛋白 (cyclinD)₁、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)、磷酸化糖原合成酶激酶 - 3β (p-GSK-3β) 表达水平。结果 通心络 + 外周血间充质干细胞移植组大鼠的干细胞数、积分光密度高于外周血间充质干细胞移植组、西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组大鼠的干细胞数、积分光密度高于外周血间充质干细胞移植组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。6 个造模组大鼠缺血下肢肌组织中 CD₁₀₅、cyclinD₁、p-Akt 表达水平低于对照组, p-GSK-3β 表达水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 5 个用药组大鼠缺血下肢肌组织中 CD₁₀₅、cyclinD₁、p-Akt 表达水平高于模型组, p-GSK-3β 表达水平低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 通心络 + 外周血间充质干细胞移植组大鼠缺血下肢肌组织中 CD₁₀₅、cyclinD₁、p-Akt 表达水平高于西洛他唑组、通心络组、外周血间充质干细胞移植组, p-GSK-3β 表达水平低于西洛他唑组、通心络组、外周血间充质干细胞移植组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 通心络联合外周血间充质干细胞移植可以通过调节 PI3K/Akt 信号通路, 促进内皮细胞增殖、分化, 从而促进糖尿病足大鼠的新生血管形成。

【关键词】 糖尿病足; 通心络; 间质干细胞移植; 血管生成

【中图分类号】 R 587.29 **【文献标识码】** A doi: 10.3969/j.issn.1007-9572.2016.13.029

郭勇英, 位庚, 李红蓉, 等. 通心络联合外周血间充质干细胞移植对糖尿病足大鼠血管新生磷脂酰肌醇 3 - 激酶 / 蛋白激酶 B 信号通路的影响研究 [J]. 中国全科医学, 2016, 19 (13): 1602 - 1606. [www.chinagp.net]

Guo YY, Wei G, Li HR, et al. Influence of tongxinluo combined with peripheral blood derived mesenchymal stem cells transplantation on the angiogenesis through PI3K/Akt signal pathway of diabetic foot rats [J]. Chinese General Practice, 2016, 19 (13): 1602 - 1606.

Influence of Tongxinluo Combined With Peripheral Blood Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation on the Angiogenesis Through PI3K/Akt Signal Pathway of Diabetic Foot Rats GUO Yong - ying, WEI Geng, LI Hong - rong, et al. Medical Department, Hospital of Traditional Chinese Medicine of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China

【Abstract】 Objective To investigate the influence of tongxinluo (TXL) combined with peripheral blood derived mesenchymal stem cells (PB - MSCs) transplantation on the angiogenesis through PI3K/Akt signal pathway of diabetic foot rats. **Methods** In March 2014, we selected 70 SPF male SD rats, and assigned 10 rats into control group and built the rest 60 rats into diabetic foot rat models. Then the model rats were randomly divided into 6 groups: model group, cilostazol group, TXL group, PB - MSCs group, TXL combined PB - MSCs (T - MSCs) group and cilostazol combined PB - MSCs (C - MSCs) group, with 10 rats in each group. 28 days after the completion of corresponding operation, PB - MSCs and the expression levels of CD₁₀₅, cyclinD₁, p-Akt and p-GSK-3β and in ischemic lower limb muscle tissue were detected and compared. **Results**

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2011AA020115); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2012CB518606); 河北省中医药管理局科研计划项目 (2014082)

作者单位: 050000 河北省石家庄市, 河北省中医院医务处 (郭勇英); 河北省络病重点实验室 (郭勇英, 位庚, 李红蓉); 河北医科大学研究生学院 (位庚, 李红蓉); 河北以岭医药研究院 (田超, 张军芳); 河北医科大学附属以岭医院内分泌科, 河北省中医药络病理论指导糖尿病足防治重点实验室 (高怀林)

通信作者: 高怀林, 050000 河北省石家庄市, 河北医科大学附属以岭医院内分泌科, 河北省中医药络病理论指导糖尿病足防治重点实验室; E-mail: gaohuailin@126.com

T - MSCs group was higher than PB - MSCs group and C - MSCs group in the number of PB - MSCs and integral optical density ($P < 0.05$); C - MSCs group was higher than PB - MSCs group in the number of PB - MSCs and integral optical density ($P < 0.05$). The 6 model groups were lower than control group in the expression levels of CD₁₀₅, cyclinD₁, p-Akt, and were higher than control group in the expression level of p-GSK-3 β ($P < 0.05$); the 5 groups that were administrated with drugs were higher than model group in the expression levels of CD₁₀₅, cyclinD₁ and p-Akt, but were lower than model group in the expression level of p-GSK-3 β ($P < 0.05$); T - MSCs group was higher than cilostazol group, TXL group and PB - MSCs group in the expression levels of CD₁₀₅, cyclinD₁ and p-Akt, and was lower than cilostazol group, TXL group and PB - MSCs group in the expression of p-GSK-3 β ($P < 0.05$). **Conclusion** TXL combined with PB - MSCs transplantation may promote the endothelial cell proliferation and differentiation by regulating PI3K/Akt signaling pathway, thus facilitating the angiogenesis of diabetic foot rats.

【Key words】 Diabetic foot; Tongxinluo; Mesenchymal stem cell transplantation; Angiogenesis

糖尿病足 (DF) 是糖尿病的严重并发症之一, 关键治疗环节为促进缺血状态下治疗性血管新生和有效侧支循环建立, 进而改善缺血状态^[1]。血管新生是一个较为复杂的过程, 可分为早、晚期两个阶段。早期包括血管内皮细胞 (VEC) 的前体细胞分化、增殖、迁移, 融合成初期血管网络; 晚期包括血管芽生、分支, 形成小血管, 血管支持细胞 (如平滑肌细胞) 分泌、充实在新生血管周围, 进而在原有血管基础上形成新的成熟血管^[2-3]。本课题组前期研究表明, 外周血间充质干细胞移植, 可以增加糖尿病足大鼠缺血下肢的血流灌注量, 促进侧支循环建立^[4]。而通心络可以改善糖尿病足大鼠的心肌梗死区微环境, 增加干细胞移植后存活率^[5], 促进血管内皮生长因子 (VEGF) 表达, 增加新生血管和侧支循环建立^[6], 增加缺血下肢的血流灌注量^[4]。本研究旨在探讨通心络联合外周血间充质干细胞移植对糖尿病足大鼠血管新生磷脂酰肌醇 3 - 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路的影响, 以探讨其涉及的分子机制, 为糖尿病并发症的临床治疗提供依据。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 于 2014 年 3 月, 选取无特定病原体 (SPF 级) 雄性 SD 大鼠 70 只, 4 周龄, 体质量 190 ~ 230 g, 由中国食品药品检定研究院提供 (实验动物许可证号: SCXK (京) 2009 - 0017; 合格证号: 11400500002012); 另选取清洁级雄性 SD 大鼠 10 只, 15 周龄, 体质量 300 g 左右, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供 (实验动物许可证号: SCXK (京) 2012 - 0001; 合格证号: 11400700026920)。

1.2 实验室药品及设备 (1) 药品: 通心络原粉 (人参、水蛭、全蝎、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、冰片等组成), 由石家庄以岭药业股份有限公司提供 (生产批号: 20120924); 西洛他唑片, 由浙江大家制药有限公司提供 (生产批号: 130801P)。药品配制和保存方法见本课题组前期研究^[4]。(2) 试剂: 链脲佐菌素 (STZ) 由美国 Amresco 公司提供 (生产批号: 1262C443), 重组人粒细胞集落刺激因子 (G - CSF) 由深圳新鹏生物工程有限公司提供 (生产批号: 201302009), 细胞处理试剂盒和 4、6 - 联脒 - 2 - 苯基吡啶 (DAPI) 由河北博海生物工程开发有限公司提供 (生产批号: 20140428、20130808), 内皮糖蛋白 (CD)₉₀、CD₁₀₅、CD_{49A}、CD_{49B}、CD_{49C}、CD₂₉、CD₁₀₄ 及 CD₁₀₅ - 荧光素 (FITC)、CD₄₄ - FITC、CD₃₄ - FITC 由德国美天旋公司提供 (生产批号:

30. APR. 2013), CD₁₀₅ 单克隆抗体、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 抗吗啡多克隆抗体 IgG、磷酸化糖原合成酶激酶 - 3 β (p-GSK-3 β) 抗吗啡多克隆抗体 IgG、细胞周期蛋白 (cyclinD₁) 兔单克隆抗体均由美国 Abcam 公司提供 (生产批号: ab137875、ab5626、ab75745、ab137875)。(3) 设备和器材: AL204 精密分析天平由瑞士梅特勒 - 托利多公司提供, CTR6000 荧光显微镜、CM1950 型切片机由德国 Leica 公司提供, 干细胞磁性分选架、分选器、分选柱由德国美天旋公司提供, 170 - 930 型电转膜仪、170 - 3940 型半干转膜仪、165 - 8001 型垂直电泳仪由美国 Bio - Rad 公司提供。

1.3 方法 70 只 SPF 级雄性 SD 大鼠中, 10 只为对照组; 60 只制作糖尿病足大鼠模型, 然后随机分为模型组、西洛他唑组、通心络组、外周血间充质干细胞移植组、西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组、通心络 + 外周血间充质干细胞移植组各 10 只。

1.3.1 模型方法 参考文献 [5 - 6], 高脂喂养大鼠 8 周, 热量配比为脂肪 59.8%, 碳水化合物 20.1%, 蛋白质 20.1%; 禁食 16 h 后, 造模组以 35 mg/kg 腹腔注射 STZ, 对照组注入同体积枸橼酸钠缓冲溶液; 以 72 h 后尾尖血糖 > 16.7 mmol/L 为造模成功。

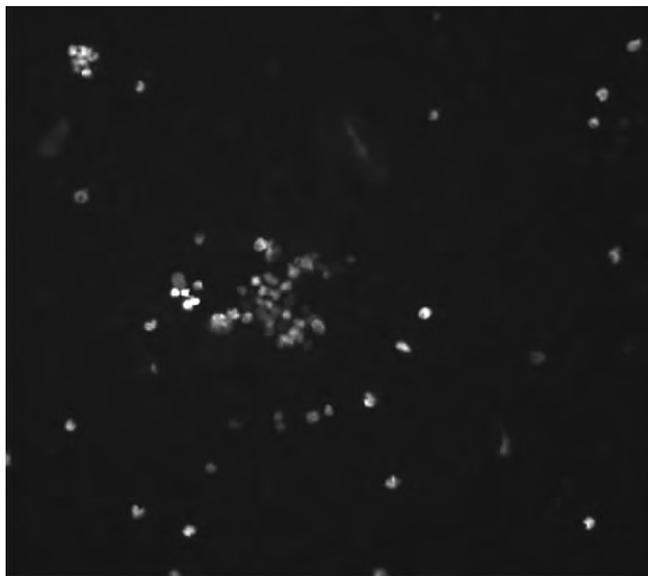
1.3.2 灌胃方法 通心络组、通心络 + 外周血间充质干细胞移植组大鼠以通心络 (0.4 g/kg, 1 次/d) 灌胃, 西洛他唑组、西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组大鼠以西洛他唑 (18 mg/kg, 1 次/d) 灌胃, 对照组、模型组、外周血间充质干细胞移植组大鼠以等体积 0.9% 氯化钠溶液灌胃。

1.3.3 手术方法 (1) 同源异体供体大鼠的外周血间充质干细胞分离方法见课题组前期研究^[4]。(2) 腹腔注射 10.0% 水合氯醛进行麻醉; 将大鼠仰卧固定, 备皮消毒; 纵行切开右侧腹股沟正中皮肤, 分离腹股沟下股动、静脉, 结扎并剪断; 创口处局部涂撒青霉素, 并进行皮肤缝合。(3) 术后 3 d, 外周血间充质干细胞移植组、西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组、通心络 + 外周血间充质干细胞移植组大鼠, 沿股动脉多点肌肉注射进行干细胞移植 (1.0×10^6 /ml), 对照组、模型组、通心络组、西洛他唑组大鼠, 同点肌肉注射等体积无菌洛苏维 (RPMI) - 1640 培养基。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 外周血间充质干细胞检测 术后 28 d, 取干细胞移植治疗大鼠的肌中段, 避光情况下行冷冻切片, 厚度为 12 μ m;

室温下干燥 1 h, 以紫外光激发下干细胞细胞核发出蓝色荧光为 DAPI 标记成功 (见图 1)。由实验室人员采用 Image-Pro Plus5.0 (IPP) 图像处理分析软件, 计算各组大鼠的干细胞数、荧光强度 B、积分光密度^[7]。



注: DAPI=4、6-联脒-2-苯基吡啶

图 1 外周血间充质干细胞的 DAPI 标记

Figure 1 DAPI marking of PB-MSCs

1.4.2 CD₁₀₅、cyclinD₁、p-Akt、p-GSK-3β 表达水平检测 将大鼠缺血下肢肌组织加入组织裂解液, 匀浆; 4℃下, 以 8 000 r/min 离心 10 min, 离心半径为 10 cm, 分离上清液。取各组蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 具体操作方法参照课题组前期研究^[4]。蛋白印迹 (Western blotting) 法检测各组大鼠的 CD₁₀₅、cyclinD₁、p-Akt、p-GSK-3β 表达水平, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参照。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据处理。

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, 组间两两比较采用 *q* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠外周血间充质干细胞检测结果比较 3 组进行了外周血间充质干细胞移植大鼠的干细胞数、积分光密度比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。其中, 通心络 + 外周血间充质干细胞移植组与外周血间充质干细胞移植组、西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组与外周血间充质干细胞移植组比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05, 见表 1)。

2.2 7 组大鼠缺血下肢肌组织中 CD₁₀₅、cyclinD₁、p-Akt、p-GSK-3β 表达水平比较 7 组大鼠缺血下肢肌组织中 CD₁₀₅、cyclinD₁、p-Akt、p-GSK-3β 表达水平比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。其中, 6 个造模组与对照组比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 模型组与 5 个用药组比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 通心络 + 外周血间充质干细胞移植组与西洛他唑组、通心络组、外周血间充质干细胞移植组比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05, 见表 2、图 2)。

表 1 3 组大鼠外周血间充质干细胞检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the detection results of PB-MSCs among the three groups

组别	例数	干细胞数 ($\times 10^6/L$)	荧光 强度 B	积分 光密度
外周血间充质干细胞移植组	10	16 ± 4	2	98 ± 3
西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组	10	21 ± 4 ^a	2	116 ± 6 ^a
通心络 + 外周血间充质干细胞移植组	10	27 ± 4 ^{ab}	2	135 ± 4 ^{ab}
<i>F</i> 值		18.96	-	168.36
<i>P</i> 值		<0.01	-	<0.01

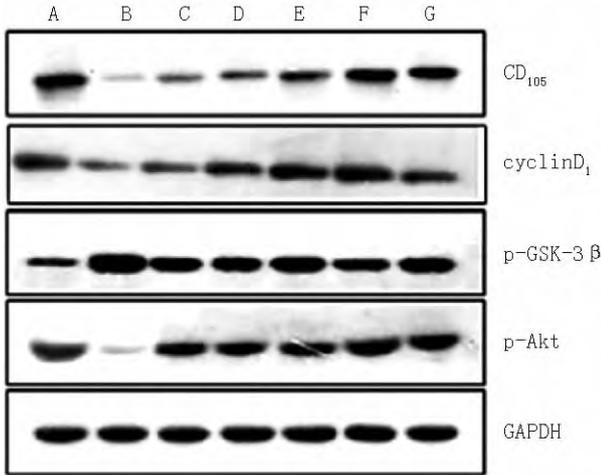
注: - 代表无此数据; 与外周血间充质干细胞移植组比较, ^a*P* < 0.05; 与西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组比较, ^b*P* < 0.05

表 2 7 组大鼠缺血下肢肌组织中 CD₁₀₅、cyclinD₁、p-Akt、p-GSK-3β 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the expression levels of CD₁₀₅, cyclinD₁, p-Akt and p-GSK-3β in ischemic lower limb muscle tissue among the seven groups

组别	例数	CD ₁₀₅	cyclinD ₁	p-Akt	p-GSK-3β
对照组	10	0.58 ± 0.03	1.23 ± 0.05	1.14 ± 0.04	0.19 ± 0.04
模型组	10	0.08 ± 0.02 ^a	0.36 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.02 ^a	1.12 ± 0.11 ^a
西洛他唑组	10	0.32 ± 0.07 ^{ab}	0.47 ± 0.03 ^{ab}	0.67 ± 0.04 ^{ab}	0.68 ± 0.01 ^{ab}
通心络组	10	0.33 ± 0.03 ^{ab}	0.55 ± 0.09 ^{abc}	0.71 ± 0.03 ^{ab}	0.70 ± 0.05 ^{ab}
外周血间充质干细胞移植组	10	0.41 ± 0.01 ^{abcd}	0.63 ± 0.02 ^{abcd}	0.82 ± 0.02 ^{abcd}	0.63 ± 0.06 ^{abd}
西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组	10	0.48 ± 0.02 ^{abcde}	0.89 ± 0.04 ^{abcde}	0.96 ± 0.08 ^{abcde}	0.53 ± 0.01 ^{abcde}
通心络 + 外周血间充质干细胞移植组	10	0.49 ± 0.02 ^{abcde}	0.93 ± 0.03 ^{abcde}	1.02 ± 0.05 ^{abcde}	0.49 ± 0.03 ^{abcde}
<i>F</i> 值		231.83	452.30	515.85	262.36
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: CD₁₀₅ = 内皮糖蛋白 105, cyclinD₁ = 细胞周期蛋白, p-Akt = 磷酸化蛋白激酶 B, p-GSK-3β = 磷酸化糖原合成酶激酶 - 3β; 与对照组比较, ^a*P* < 0.05; 与模型组比较, ^b*P* < 0.05; 与西洛他唑组比较, ^c*P* < 0.05; 与通心络组比较, ^d*P* < 0.05; 与外周血间充质干细胞移植组比较, ^e*P* < 0.05



注: A = 对照组, B = 模型组, C = 通心络组, D = 西洛他唑组, E = 外周血间充质干细胞移植组, F = 通心络 + 外周血间充质干细胞移植组, G = 西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组; CD₁₀₅ = 内皮糖蛋白 105, cyclinD₁ = 细胞周期蛋白, p-GSK-3β = 磷酸化糖原合成酶激酶-3β, p-Akt = 磷酸化蛋白激酶 B, GAPDH = 甘油醛-3-磷酸脱氢酶
图 2 7 组大鼠缺血下肢肌组织中 CD₁₀₅、cyclinD₁、p-Akt、p-GSK-3β 表达

Figure 2 Expression of CD₁₀₅, cyclinD₁, p-Akt and p-GSK-3β in ischemic lower limb muscle tissue among the seven groups

3 讨论

糖尿病患者存在长期的糖脂代谢紊乱和氧化应激引起的内皮功能损害,导致其血管功能障碍,从而引发动脉粥样硬化,血管壁弹性减弱、管腔阻塞或狭窄,累及下肢远端动脉,最终导致肢体远端血液循环障碍,肢端缺血低氧,形成糖尿病足,严重者甚至可能会出现溃烂、坏疽^[8-9]。长期的高血糖状态不仅会导致血管病变,发生严重缺血事件,也会严重损伤侧支血管的形成能力^[10]。因此,糖尿病足的临床治疗关键为促进缺血状态下的血管新生和侧支循环形成。

目前,临床上常用的糖尿病足治疗方法有药物治疗、外科手术及血管腔内治疗,但目前尚缺乏对远端流出道严重狭窄患者的有效治疗方法。西洛他唑具有明显的抗血小板聚集和扩张血管作用,可以防止血栓形成和血管闭塞,临床上常被应用于糖尿病足患者的微循环改善治疗。干细胞是一类具有自我复制和多向分化潜能的细胞,能产生表现型和基因型与本身完全相同的子细胞。随着干细胞移植技术在再生医学领域的发展,外周血间充质干细胞移植逐渐成为糖尿病足患者的临床治疗新方法。根据干细胞可以分化为血管内皮细胞、形成新生血管的原理,可以将外周血间充质干细胞分离出来,移植到患者的缺血下肢,使其逐渐分化形成新生血管,建立侧支循环,从而改善和恢复缺血下肢血流,达到治疗糖尿病足的目的。

中医学认为,消渴日久,气阴两虚,脉络瘀阻,血行不畅,肢端失养,久病入络,可诱发消渴脱疽。络脉学说对血管病变的防、治均有重要的指导作用,其根据中医脉与血管、脉的分支络脉与中小血管、络脉末端的孙络与微血管、微循环在解剖形态学和生理功能方面的高度相关性,提出了“络脉 -

血管系统病”概念^[11]。糖尿病足是糖尿病日久累及肢体大、中、小、微血管的一类并发症,属中医“消渴脱疽”范畴,故糖尿病足亦属于“络脉 - 血管系统病”研究范畴。在以络脉“不通”为实质的共性发病机制中,依据“络以通为用”的治疗总则,而通心络是通络药物的代表方药。既往研究结果表明,通心络具有促进鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)和脑缺血后血管新生的作用^[12-13]。

血管新生指内皮细胞在原有血管的基础上,出现增殖、迁移、重塑,从而形成新血管的过程^[14]。常用标志物包括 CD₃₄、CD₃₁、CD₁₀₅、CD₁₄₆等。CD₁₀₅可以调节内皮 - 间质的信号传递,参与血管生成过程,与泛内皮细胞标志物(如 CD₃₁、CD₃₄相关抗原)不同的是,CD₁₀₅仅在处于增殖状态的血管内皮细胞中高表达,而在正常组织的血管内皮细胞中无或仅有微弱表达^[15-17],故其可作为新生血管的重要标志物。本研究结果显示,与对照组比较,模型组大鼠肌组织中的 CD₁₀₅表达明显降低,说明糖尿病足大鼠的新生血管受到抑制,新生血管数量不足。在血管堵塞不易开通的情况下,侧支循环数量减少,新生血管数量不足,血供减少是糖尿病足患者创口不易愈合的重要原因。本研究中,与模型组相比,各用药组大鼠肌组织中的 CD₁₀₅表达水平平均升高,且通心络 + 外周血间充质干细胞移植组大鼠肌组织中的 CD₁₀₅水平高于通心络组、西洛他唑组及外周血间充质干细胞移植组。术后 28 d,通心络 + 外周血间充质干细胞移植组大鼠的干细胞数和积分光密度优于外周血间充质干细胞移植组和西洛他唑 + 外周血间充质干细胞移植组,说明通心络联合干细胞移植治疗可以增加糖尿病足大鼠的新生血管数量,改善血供情况。

PI3K/Akt 信号通路的激活主要发挥抗凋亡、促进内皮细胞增殖、迁移的保护作用,既往研究结果表明,激活的 PI3K/Akt 信号通路可能在干细胞生长、存活及增殖中扮演重要角色^[18-21]。本研究中,与对照组比较,模型组大鼠肌组织中的 p-GSK-3β 水平较高, p-Akt、cyclinD₁ 水平较低;与模型组比较,各用药组大鼠肌组织中的 p-GSK-3β 表达水平降低, p-Akt、cyclinD₁ 表达水平升高,且通心络 + 外周血间充质干细胞移植组大鼠肌组织中 p-GSK-3β 表达水平较低, cyclinD₁、p-Akt 表达水平较高。提示通心络联合外周血间充质干细胞移植具有促进糖尿病足大鼠血管新生的作用,其可能是通过激活 PI3K/Akt 信号通路,上调 p-Akt、抑制 p-GSK-3β 表达,进而上调 cyclinD₁ 表达,来促进血管内皮细胞增殖、迁移以及局部缺血区新生血管形成的。

作者贡献: 郭勇英进行实验设计与实施、撰写论文、成文并对文章负责; 位庚、李红蓉、田超进行实验实施; 张军芳进行实验评估、资料收集; 高怀林进行质量控制与审核。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] Yilmaz I, Bayraktar N, Ceyhan K, et al. Evaluation of vascular endothelial growth factor A and endostatin levels in induced sputum and relationship to bronchial hyperreactivity in patients with seasonal allergic rhinitis [J]. Am J Rhinol Allergy, 2013, 27 (3): 181 - 186.

- [2] 谷涌泉, 佟铸. 干细胞移植促进血管新生的研究进展 [J]. 中华细胞与干细胞杂志: 电子版, 2013, 3 (2): 1-5.
- [3] 牟心红, 张可满, 呼文亮. 血管生成过程的分子调节及抗血管生成药物的研究策略 [J]. 武警医学, 2003, 14 (6): 374-376.
- [4] Guo YY, Gao HL, Sun Y, et al. Effect of tongxinluo ultrafine powder with peripheral blood mesenchymal stem cell transplantation on lower limb ischemia in diabetic rats [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 56 (6): 506-510. (in Chinese)
郭勇英, 高怀林, 孙颖, 等. 通心络超微粉联合外周血间充质干细胞移植对糖尿病大鼠下肢缺血的影响 [J]. 中医杂志, 2015, 56 (6): 506-510.
- [5] Yang SJ, Chen B, Luo T, et al. Construction and evaluation of rat hindlimb acute ischemia model [J]. Chinese Journal of General Surgery, 2009, 18 (6): 580-583. (in Chinese)
杨盛家, 陈兵, 罗涛, 等. 大鼠后肢急性缺血模型的构建及评估 [J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18 (6): 580-583.
- [6] Zhou YS, Gao Y, Li B, et al. A rat model of type 2 diabetes mellitus induced by high fat chow and low dose streptozotocin injection [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2005, 13 (3): 154-158. (in Chinese)
周迎生, 高妍, 李斌, 等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13 (3): 154-158.
- [7] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors [J]. Cancer, 2000, 89 (12): 2637-2645.
- [8] 任叶高, 陆再英, 陈灏珠, 等. 内科学 [M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [9] Liu HM, Sun CB. Analysis of correlation between different age diabetes clinical serum lipid levels and atheroma [J]. Anhui Medical Journal, 2015, 36 (6): 646-649. (in Chinese)
刘红梅, 孙传伯. 糖尿病患者血脂水平与动脉粥样硬化的相关性分析 [J]. 安徽医学, 2015, 36 (6): 646-649.
- [10] Abaci A, Oğuzhan A, Kahraman S, et al. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels [J]. Circulation, 1999, 99 (17): 2239-2242.
- [11] Wu YL. The study of correlation between collateral system and vascular system [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2007, 48 (1): 5-8. (in Chinese)
吴以岭. “脉络-血管系统”相关性探讨 [J]. 中医杂志, 2007, 48 (1): 5-8.
- [12] Wang WJ, Fu XD, Chen WH, et al. The experiment research of angiogenesis effect of tongxinluo capsule on the chick embryo chorioallantoic membrane model [J]. J Diffic and Compel Cas, 2003, 2 (1): 2-4. (in Chinese)
王文健, 傅晓东, 陈伟华, 等. 通心络促血管生成作用的实验研究 [J]. 疑难病杂志, 2003, 2 (1): 2-4.
- [13] Chang LP, Wei C, Jia ZH, et al. Effects of tongxinluo on angiogenesis and the volume of blood perfusion in ischemic stroke rats [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2012, 32 (12): 1667-1670. (in Chinese)
常丽萍, 魏聪, 贾振华, 等. 通心络对缺血性脑卒中大鼠微血管新生及血流灌注状态的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32 (12): 1667-1670.
- [14] Ni X, Yan M. Researching progress in the functions of VEGF receptor [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2008, 20 (1): 120-124. (in Chinese)
倪效, 燕敏. VEGF受体功能研究进展 [J]. 生命科学, 2008, 20 (1): 120-124.
- [15] Dai M, Huang Y. Role of CD₁₀₅ in neovascularization of atherosclerotic plaques: a minireview [J]. Chin J Milt Organ Dis Elderly, 2013, 12 (11): 868-870. (in Chinese)
戴淼, 黄芸. CD₁₀₅在动脉粥样硬化血管新生中的研究进展 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2013, 12 (11): 868-870.
- [16] Martone T, Rosso P, Albera R, et al. Prognostic relevance of CD₁₀₅⁺ microvessel density in HNSCC patient outcome [J]. Oral Oncol, 2005, 41 (2): 147-155.
- [17] Huang XJ, Qi WH, Wang L, et al. Expression and clinicopathological significance of CD₃₁ and CD₁₀₅ in ovarian epithelial carcinoma [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2012, 21 (6): 544-550. (in Chinese)
黄小娟, 齐文慧, 王立, 等. CD₃₁和CD₁₀₅在卵巢上皮性肿瘤中的表达及其临床病理意义 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21 (6): 544-550.
- [18] Liu LN, Shen ZF. A new target for diabetes therapy: advances in the research of glycogen synthase kinase-3 inhibitors [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2007, 42 (12): 1227-1231. (in Chinese)
刘率男, 申竹芳. 糖尿病治疗新靶点糖原合成酶激酶-3抑制剂的研究进展 [J]. 药理学学报, 2007, 42 (12): 1227-1231.
- [19] Johnson MA, Ables JL, Eisch AJ. Cell-intrinsic signals that regulate adult neurogenesis in vivo: insights from inducible approaches [J]. BMB Rep, 2009, 42 (5): 245-259.
- [20] Khodosevich K, Monyer H. Signaling involved in neurite outgrowth of postnatally born subventricular zone neurons in vitro [J]. BMC Neurosci, 2010, 11: 18.
- [21] Bruel-Jungerman E, Veyrac A, Dufour F, et al. Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus [J]. PLoS One, 2009, 4 (11): e7901.
(收稿日期: 2016-01-03; 修回日期: 2016-03-24)
(本文编辑: 王凤微)