

右归丸对糖尿病视网膜病变大鼠 PI3K/Akt 信号通路的影响

李欢¹, 罗向霞², 冯玉沛³, 王晗³

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81460685)

作者单位: ¹(411100) 中国湖南省湘潭市妇幼保健院儿童眼保健科; ²(730050) 中国甘肃省兰州市, 甘肃省中医院眼科; ³(730050) 中国甘肃省兰州市, 甘肃中医药大学

作者简介: 李欢, 2013 级甘肃中医药大学中医五官科学硕士研究生, 研究方向: 中医中药治疗眼底病。

通讯作者: 罗向霞, 2005 级成都中医药大学中医五官科学博士研究生, 主任医师, 研究方向: 中医中药治疗眼底病。jessica_lxx@163.com

收稿日期: 2016-07-13 修回日期: 2016-11-16

Effects of a traditional Chinese patent medicine for PI3K/Akt pro-survival signal channel in diabetic retinopathy rat

Huan Li¹, Xiang-Xia Luo², Yu-Pei Feng³, Han Wang³

Foundation item: National Nature Science Foundation Project (No. 81460685)

¹Children's eye health Department, Xiangtan City of Hunan Province Maternal and Child Health Hospital, Xiangtan 411100, Hunan Province, China; ²Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; ³Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Correspondence to: Xiang-Xia Luo. Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. jessica_lxx@163.com
Received: 2016-07-13 Accepted: 2016-11-16

Abstract

• AIM: To investigate the effects of *reinforcing yang from yin* of a traditional Chinese patent medicine called YouguiWan for PI3K/Akt pro-survival signal channel in diabetic retinopathy rat.

• METHODS: A total of 80 SPF SD rats were selected, 10 rats were selected to set up normal group. The remaining 70 rats were given streptozotocin (60mg/kg) peritoneal injection combined with intravitreal injection of VEGF (0.05μg) to establish proliferative diabetic retinopathy rat model. After the model successful, the rats were divided into four groups: YouguiWan high dose group, YouguiWan middle dose group, YouguiWan low dose group and model group. The treatment groups were fed daily YouguiWan concentrate, model group and the normal group received daily doses of distilled water.

After intragastric administration for 3mo, the PI3K, Akt expression of retinal tissue were observed by SP-immunohistochemistry and Western-blot method respectively.

• RESULTS: Immunohistochemical observation showed PI3K, Akt expression immunohistochemical staining, were brown particles on the retina. Normal PI3K, Akt expression weakly positive immunological reaction unit located in the ganglion cell layer. The kernel was also a small amount of expression. Model group, each YouguiWan treatment group rat retinal ganglion cell layer, inner plexiform layer and the inner and outer layer of the particles had a positive expression. Compared with the model group, YouguiWan high dose group PI3K, Akt expression were decreased. YouguiWan low dose group decreased expression was not obvious. Compared with the low dose group, YouguiWan high dose group PI3K, Akt expression was decreased. The expression of the strength of the YouguiWan, high dose group showed no significant difference. Western-blot test results showed that compared with the normal group, model group, treatment group, the expression difference was statistically significant ($P < 0.01$). Model group, treatment group, PI3K, Akt protein levels were significantly increased. Compared with the model group, the YouguiWan high-dose group was statistically significant ($P < 0.05$). YouguiWan high dose group PI3K, Akt protein expression were decreased, YouguiWan low dose group was no significant difference ($P > 0.05$). Compared with the low dose group, YouguiWan high-dose group was statistically significant ($P < 0.05$). YouguiWan high dose group PI3K, Akt expression levels were decreased. YouguiWan high dose group was not statistically significant difference ($P > 0.05$).

• CONCLUSION: *Reinforcing yang from yin* of YouguiWan can affect PI3K, Akt protein expression and inhibit PI3K/Akt signaling pathway, delay the disease process of diabetic retinopathy, propose new ideas and scientific basis for the treatment of diabetic retinopathy and blindness prevention treatment.

• KEYWORDS: YouguiWan; *reinforcing yang from yin*; diabetic retinopathy; PI3K/Akt

Citation: Li H, Luo XX, Feng YP, *et al.* Effects of a traditional Chinese patent medicine for PI3K/Akt pro-survival signal channel in diabetic retinopathy rat. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016; 16(12):2195-2199

摘要

目的:探讨“阴中求阳”立法之右归丸对糖尿病视网膜病变大鼠 PI3K/Akt 信号通路的影响。

方法:SD 大鼠 80 只,随机分组,10 只为正常组,余大鼠通过一次性腹腔注射链脲佐菌素溶液(60mg/kg)联合大鼠玻璃体腔注射 VEGF(0.05 μ g)的方式建立糖尿病视网膜病变增殖期大鼠模型。模型建立成功后,将最终成模大鼠随机分为 4 组:右归丸高中低剂量组、模型组,右归丸高中低剂量组每天给予相应右归丸浓缩液浓度进行灌胃,模型组、正常组每天给予等剂量蒸馏水灌胃。连续灌胃 3mo 后,采取 SP 免疫组织化学、Western-blot 法分别观察检测大鼠视网膜组织 PI3K 和 Akt 的表达情况。

结果:免疫组织化学观察显示 PI3K 和 Akt 免疫组化染色的阳性表达,在视网膜上均为棕黄色颗粒;正常组 PI3K 和 Akt 表达部分分布于神经节细胞层,内核也有少量表达,呈弱阳性免疫反应;模型组、右归丸各治疗组大鼠视网膜神经节细胞层、内丛状层及内外颗粒层都有阳性表达;与模型组比较,右归丸中、高剂量组 PI3K 和 Akt 表达均减弱,右归丸低剂量组表达减弱不明显;与右归丸低剂量组比较,右归丸中、高剂量组 PI3K 和 Akt 表达减弱;右归丸中、高剂量组表达强弱比较无差异。Western-blot 检测结果显示与正常组比较,模型组、治疗组表达差异有显著统计学意义($P<0.01$),模型组、治疗组 PI3K 和 Akt 蛋白表达水平显著升高;与模型组比较,右归丸中、高剂量组表达差异有统计学意义($P<0.05$),右归丸中、高剂量组 PI3K 和 Akt 蛋白表达水平均降低,右归丸低剂量组表达差异无统计学意义($P>0.05$);与右归丸低剂量组比较,右归丸中、高剂量组表达差异有统计学意义($P<0.05$),右归丸中、高剂量组 PI3K 和 Akt 表达水平下降;右归丸中、高剂量组表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

结论:基于“阴中求阳”立法之右归丸可以通过影响 PI3K 和 Akt 蛋白表达水平,抑制 PI3K/Akt 信号通路活化,延缓糖尿病视网膜病变的病变进程,为糖尿病视网膜病变防治治疗提出新的治疗思路与科学依据。

关键词:右归丸;阴中求阳法;糖尿病视网膜病变;PI3K/Akt

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.12.06

引用:李欢,罗向霞,冯玉沛,等.右归丸对糖尿病视网膜病变大鼠 PI3K/Akt 信号通路的影响.国际眼科杂志 2016;16(12):2195-2199

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)作为糖尿病最常见、严重影响视功能且治疗最为棘手的眼部并发症,同时也已成为当前世界致盲率最高的疾病之一。随着我国糖尿病发病率的激增,DR 患病率已达 44%~51.3%,视功能损害、致盲率日益见长^[1]。国际糖尿病研究所的一份报道显示:几乎所有的 1 型 DM 以及超过 60% 的 2 型 DM 患者在 20a 后均发生不同程度的 DR,其中发生增殖期改变者约 18%,致盲者占 20%^[2]。中国北方邯郸 DR 流行病学调查显示:30 岁以上 DM 患者的 DR 发病率为 43.1%,糖尿病患者失明率是非糖尿病患者的 25 倍,如果不及时治疗,50% 的 DR 患者在进入增殖期之

后的 5a 若不积极采取治疗将完全失明^[3]。PI3K/Akt 信号通路作为参与内皮细胞迁移、增殖和血管发生功能紊乱的重要途径之一,在 DR 的新生血管形成过程中同样发挥着重要作用。近年来随着 DR 中医病机研究的深入,越来越多证据表明 DR 在进入增殖期后主要以阳虚病机为关键。“阴中求阳”法作为温阳类方剂的经典配伍方法,其治疗阳虚功效已被基础研究或临床研究所证实,但有关对 PI3K/Akt 表达的影响少有文献报道。基于此背景,本实验旨在探讨“阴中求阳”法是否可以通过影响 PI3K 和 Akt 蛋白的表达,抑制 PI3K/Akt 通路激活,进而探讨基于“阴中求阳”立法之右归丸延缓糖尿病视网膜病变进程的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 80 只,8 周龄,雌雄各半(分笼喂养),体质量 200~220g,由甘肃中医药大学科研实验动物中心提供[许可证号:SCXK(甘)2011-0001]。

1.1.2 实验试剂与设备 链脲佐菌素(北京博爱科贸生物有限公司);VEGF(上海派普泰克生物制剂有限公司);10% 荧光素钠注射液(Alcon Laboratories, Inc);Rabbit Anti-AKT antibody、Rabbit Anti-PI3K/P85 alpha antibody(北京博奥森生物技术公司);HRP 标记兔抗鼠一抗、浓缩型 DAB 溶液及底物、SP 检测试剂盒(Solarbio 生物公司);血糖仪、血糖试纸(罗氏上海公司);微量加样器、微量加样吸头(上海飞鸽生物有限公司);Topcon 眼底血管造影设备(HRA-II 型,日本 Topcon 公司);光学显微镜(日本 Nikon 公司);解剖显微镜(德国 OPMJ-CS 公司);-80 $^{\circ}$ C 冰箱(青岛海尔);电泳仪、电泳槽、转移槽(北京六一仪器厂);凝胶玻璃板、固定夹(上海汉诺仪器有限公司)。

1.1.3 实验药物 按照《中华人民共和国药典 2010 版》中所规定的右归丸方药组成剂量如下:熟地黄 240g,山茱萸、当归各 90g,山药、枸杞、杜仲、菟丝子、鹿角胶各 120g,制附子、肉桂各 60g,以上药材均购自兰州安泰堂药店。右归丸由甘肃省中医院中药研究院提取浓缩至 2.3g/mL,4 $^{\circ}$ C 冷藏。

1.2 方法

1.2.1 造模方法 80 只 SD 大鼠适应性喂养 1wk 后,随机分组,10 只设为正常组,其余大鼠采用链脲佐菌素液 60mg/kg 行腹腔注射(注射前禁食不禁水 16h),注射后分别于 72h,1、2、3、4wk 测定大鼠空腹血糖,以血糖值 \geq 16.7mmol/L 者确定为糖尿病大鼠;继而微量进样器抽取 0.05 μ g VEGF,于颞侧角膜缘后 2mm 水平经过睫状体平坦部进入玻璃体腔,缓慢推动进样器留针 10s,4wk 后对玻璃体腔注射的大鼠分批行眼底荧光造影检查,造影出现背景荧光增强、血管迂曲扩张、新生血管荧光渗漏等表现者为糖尿病视网膜病变增殖期大鼠模型建立成功。

1.2.2 分组与给药 将最终成模的大鼠筛选 40 只随机分为右归丸低剂量组、右归丸中剂量组、右归丸高剂量组、模型组 4 组,以及模型建立前所设立正常组,共 5 组,每组 10 只。依照贺石林《中医科研设计与统计方法》进行的给药剂量换算如下:(1)右归丸高剂量组:每天灌胃中药右归丸浓缩液 2.32g/100g 体质量,相当于 12 倍成人剂量;右归丸中剂量组:每天灌胃中药右归丸浓缩液

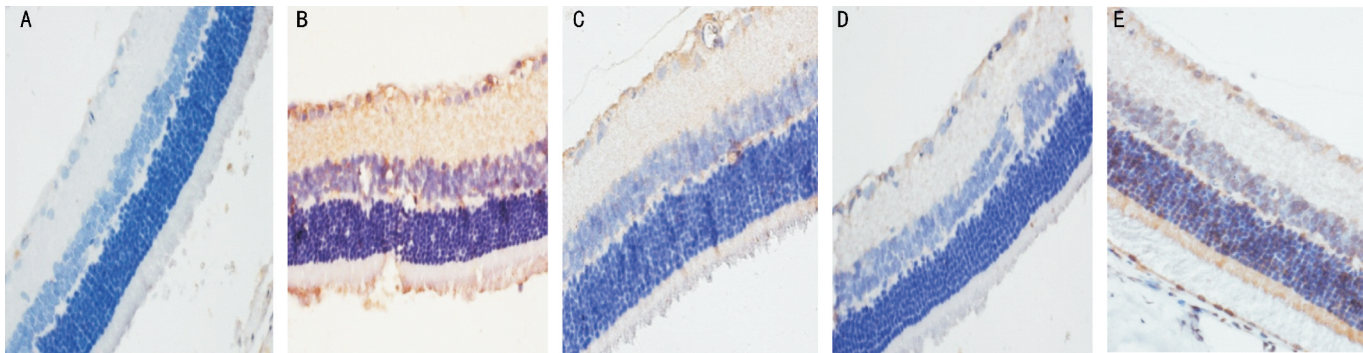


图1 各组大鼠视网膜 PI3k 的阳性表达情况($\times 400$) A:正常组;B:模型组;C:高剂量组;D:中剂量组;E:低剂量组。

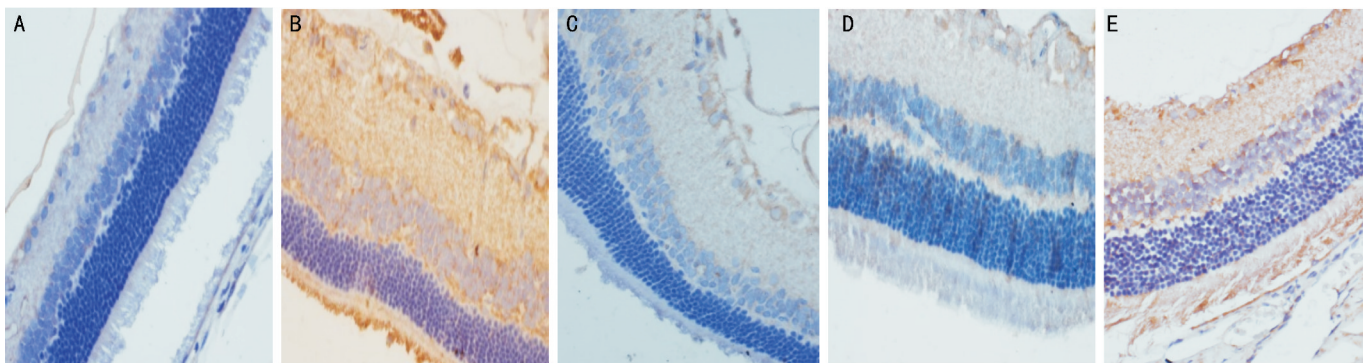


图2 各组大鼠视网膜 Akt 的阳性表达情况。PI3k 和 Akt 免疫组化染色的阳性表达,在视网膜上均表现为棕黄色颗粒。正常组 PI3k 和 Akt 表达部分分布于神经节细胞层,内核也有少量表达,呈弱阳性免疫反应。模型组、右归丸各治疗组大鼠视网膜神经节细胞层、内丛状层及内外颗粒层都有阳性表达($\times 400$) A:正常组;B:模型组;C:高剂量组;D:中剂量组;E:低剂量组。

1. 16g/100g 体质量,相当于 6 倍成人剂量;右归丸低剂量组:每天灌胃中药右归丸浓缩液 0.58g/100g 体质量,相当于 3 倍成人剂量;模型组、正常组每天给予等剂量蒸馏水灌胃,连续灌胃给药 3mo。

1.2.3 实验动物取材 给药 3mo 后,处死大鼠,迅速摘除眼球,部分眼球浸泡于 4% 多聚甲醛溶液内;部分眼球于解剖显微镜下迅速剥取视网膜组织,置于一次性无菌 EP 管后,放入 -80°C 冰箱保存,备用。

1.2.4 指标检测

1.2.4.1 SP-免疫组织化学检测大鼠视网膜组织 PI3K/p85 和 Akt 阳性表达 (1)石蜡切片常规烤片,二甲苯脱蜡和梯度酒精水化;(2)将切片置于柠檬酸盐缓冲液中进行防脱处理;(3)每张切片滴加过辣根氧化酶阻断溶液 50 μL ,以阻断内源性过氧化物酶;(4)滴加 5% 正常山羊血清 50 μL ,室温下孵育 15min;(5)滴加一抗 PI3k/p85(工作液浓度 1:100)50 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24h,其中 Akt(工作液浓度 1:150),操作流程同 PI3k/p85 的操作流程。(6)滴加生物素标记兔抗鼠多抗 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10min;(7)滴加 50 μL 链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60min;(8)滴加 DAB 溶液 100 μL ,显微镜下控制显色时间;(9)苏木素复染;(10)二甲苯透明,树脂封片。

1.2.4.2 Western-blot 法检测大鼠视网膜组织 PI3K/p85 和 Akt 活性蛋白表达 以每 20mg 组织加 200~400 μL 裂解液的比例进行裂解,运用电动组织细胞匀浆器进行 1min 匀浆后,离心取各组上清测浓度;取 80 μg 蛋白与加样缓冲液混匀变性;电泳、转膜、封闭;PI3k/p85 和 Akt 一抗(抗体稀释度均为 1:300,内参抗体稀释度为 1:1000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗孵育 1h,进行后续发光、压片、显影、定影等, β -actin 为内参;Image J 软件分析其灰度值。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据的统计分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表达,组间比较采用单因素的方差分析,并进一步用 LSD-*t* 做两两比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,以 $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态观察 造模期间,链脲佐菌素注射后大鼠死亡 5 只,7 只由于血糖持续低于 16.7mmol/L 予以剔除;玻璃体腔注射后出现玻璃体积血 4 只,并发眼内炎 2 只,最终成模 62 只。给药期间,右归丸高剂量组死亡 1 只大鼠,模型组、右归丸中剂量组及右归丸低剂量组各死亡 2 只。分析死亡原因可能为血糖水平过高以及个别大鼠链脲佐菌素注射后所引起的肠胀气。

2.2 SP-免疫组织化学法观察各组大鼠视网膜组织 PI3K 和 Akt 的阳性表达情况 与模型组比较,右归丸中、高剂量组 PI3k 和 Akt 表达均减弱,右归丸低剂量组表达减弱不明显;与右归丸低剂量组比较,右归丸中、高剂量组 PI3k 和 Akt 表达减弱;右归丸中、高剂量组表达强弱比较无差异(图 1、2)。

2.3 Western-blot 法检测各组大鼠视网膜组织 PI3k 和 Akt 活性蛋白的表达 Western-blot 法检测大鼠视网膜 PI3k 和 Akt 蛋白表达水平,结果显示:与正常组比较,模型组、治疗组表达差异有显著统计学意义($P<0.01$),模型组、治疗组 PI3k 和 Akt 蛋白表达水平显著升高;与模型组比较,右归丸中、高剂量组表达差异有统计学意义($P<0.05$),右归丸中、高剂量组 PI3k 和 Akt 蛋白表达水平均降低;与右归丸低剂量组比较,右归丸中、高剂量组表达差异有统计学意义($P<0.05$),右归丸中、高剂量组 PI3k 和 Akt 表达水平下降;右归丸中、高剂量组表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$,表 1,图 3、4)。

3 讨论

DR 的发生发展是一个复杂的病理过程,引起 DR 发生一系列病理改变的原因涉及细胞因子、信号转导代谢酶、炎症及离子通道等相关基因的异常变化^[4]。新生血管形成是 DR 进入增殖期的特征性病理标志,防止并抑制 DR 新生血管形成是延缓其病变进程的关键靶点。PI3K-AKT 通路广泛存在细胞中,是参与作为细胞中广泛存在的信号通路之一,PI3K/Akt 通路的主要作用是通过参与细胞生长、增殖、分化的调节来实现的^[5]。当该信号通路处于激活状态时不仅能加速内皮细胞的存活周期,与血管内皮生长因子协同作用于细胞的存活、迁移,最终诱导新生血管形成,从而形成一条完整的促存活信号通路^[6]。Akt 作为调节丝氨酸激酶的抗凋亡信号之一,主要是通过调节作为内皮细胞从细胞周期 G1 期到 S 期重要中介的细胞周期蛋白 D1 的水解以及其在细胞内的定位,以达到干扰 G1 过度 S 期的目的,从而发挥其调节内皮细胞增殖、迁移以及诱导血管新生的关键作用^[7]。同时,PI3k 被激活后,其第二信使 PIP3 可刺激下游更多的信号分子,致使信号传导增强,进一步使 PI3k 信号通路在内皮细胞迁移、增殖以及血管形成方面等病理改变方面的作用增强^[8]。周赛君等在进行高糖体外实验室时发现,由于高糖所引起的缺血缺氧环境可激活加速内皮细胞内信号通路 PI3k/Akt 中 Akt 的表达,并使其磷酸化增加,继而加速新生血管形成^[9]。

基于 DR 源于中医“消渴”,故其属于中医“消渴目病”范畴。李志英等在对糖尿病中医证型与 DR 分期关系进行探讨时发现,DR 在进入 PDR 后其症候以血瘀气滞证和阴阳两虚证居多,病程超过 10a 者均以阳虚证为主^[10]。为进一步研究并证实阳虚与 DR 病情进展的关系,明确阳虚在 DR 进入 PDR 病变过程中所起到的关键作用。段俊国等在对 DR 病情进展与阳虚病机关系进行研究时也证实阳虚可能影响机体能量代谢,致使机体内环境发生重大变化,促使那些能刺激 DR 发生增殖性改变的新生血管因子的相关基因异常表达,使 DR 从非增殖期进入增殖期,继而推动 DR 的病变进程^[11]。同期,罗向霞等在对 DR 阳虚病机的代谢组学物质基础进行实验研究时结果也表明,DR 患者中无阳虚证与阳虚证在代谢组指纹图谱上存在一定的差异性,阳虚可能影响整个机体的能量代谢,从而引起机体的内环境发生一系列重大变化,最终加速 DR 的病变进展^[12]。

“阴中求阳”作为中医方剂配伍的经典形式之一,更是温阳类方剂最主要的配伍形式,明代张介宾《景岳全书》的右归丸是其进一步发展,故有张介宾“善补阳者,必于阴中求阳,则阳得阴助而生化无穷”这一配伍意义精辟而深刻的概括^[13]。仲景在《金匮要略》中云“男子消渴,小便反多,以饮一斗,小便一斗,肾气丸主之”首开温阳治疗消渴的先河^[14]。近代,诸多医家也皆延用温阳法治疗本病,也取得了一定疗效。如桑景武在治疗久施养阴润燥之品无效的糖尿病患者时,认为多因肾阳虚所致,因而在遣方用药过程中喜加用附子以达到温阳之效^[15]。然而,各医家在单纯使用温阳法治疗消渴的同时,也都一致主张须兼顾气血,以免温补太过,应在众多补阳之品中,适当地添加一些滋阴清润之品,以达“阴中求阳”之效^[16]。如刘文

表 1 各组大鼠 Akt 和 PI3k 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Akt	PI3k
正常组	1.040±0.058	0.966±0.041
模型组	2.224±0.027 ^d	2.156±0.013 ^d
右归丸高剂量组	1.473±0.063 ^{a,d,e}	1.271±0.045 ^{a,d,e}
右归丸中剂量组	1.441±0.015 ^{a,d,e}	1.221±0.020 ^{a,d,e}
右归丸低剂量组	2.189±0.007 ^d	2.030±0.011 ^d

注:^a $P<0.05$ vs 模型组;^d $P<0.01$ vs 正常组;^e $P<0.05$ vs 右归丸低剂量组。

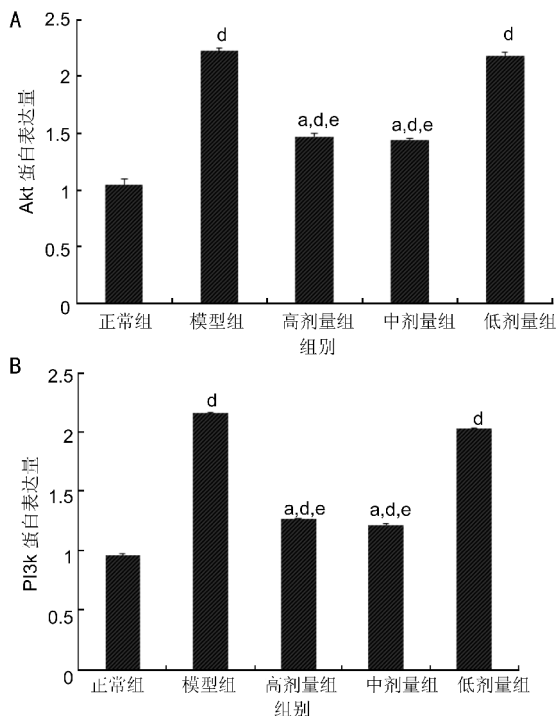


图 3 各组大鼠视网膜组织中 Akt 和 PI3k 蛋白的相对表达 A: Akt; B: PI3k。^a $P<0.05$ vs 模型组;^d $P<0.01$ vs 正常组;^e $P<0.05$ vs 右归丸低剂量组。

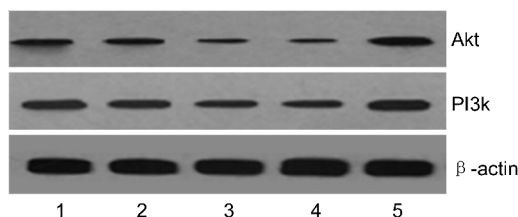


图 4 Akt 和 PI3k 蛋白在视网膜组织中的表达水平 1:右归丸低剂量组;2:右归丸中剂量组;3:右归丸高剂量组;4:正常组;5:模型组。

华^[17]观察中医对 DR 治疗疗效时也发现,单纯运用温阳法治疗,多数 DR 患者眼底病理性改变仍在继续恶化,从而得出临床上一味地采用辛、甘、温热的温阳之品,使整个机体处于温燥的状态中,能一定程度上加速 DR 眼底改变的结论;因此对阴阳两虚者,他用右归丸作为基础方,另配伍茯苓、太子参、益母草等养阴滋阴之品后疗效确切。同时,现代诸多医家临床治疗糖尿病以及其并发症 DR 时,皆认为一味地执养阴清热的治法有失偏颇,皆喜在采用温阳法时,适当佐以养阴之法,以达到扶正固本,标本兼治之效,且临证每获佳效^[18]。

本实验研究结果显示与正常组比较,模型组、治疗组

PI3k 和 Akt 表达显著,提示在 DR 病变进程中,PI3k 和 Akt 的表达增强,PI3k/Akt 信号通路处于激活状态。国内外也有类似文献证实在 DR 的发生发展的过程中,居高不下血糖环境可激活 PI3k/Akt 这一信号通路,促使各类细胞因子合成与释放增多,进而加速 DR 病变进程。给予“阴中求阳”立法之右归丸灌胃治疗后,右归丸中、高剂量组 PI3k 和 Akt 表达降低,PI3k/Akt 信号通路一定程度上被抑制,表明“阴中求阳”法可能通过调控 PI3k/Akt 信号通路,一定程度上抑制视网膜新生血管的形成,延缓 DR 病变进程,对其增殖期起到一定的治疗作用。

参考文献

- 1 陈桦. ANG-1 对大鼠糖尿病视网膜病变新生血管形成的影响. 南昌大学医学院 2010
- 2 罗向霞, 段俊国, 张富文. 以眼底荧光血管造影评价芪明颗粒对糖尿病视网膜病变的治疗作用. 成都中医药大学 2006
- 3 孙心怡. 糖尿病视网膜病变非增殖期中药方剂治疗进展. 辽宁中医药大学学报 2013;15(11):129-131
- 4 Radha V, Rema M, Mohan V. Genes and diabetic retinopathy. *Ind J ophthalmol* 2002;50(1):5
- 5 陶丹. PI3K-AKT 通路与糖尿病视网膜病变. 世界最新医学信息文摘 2016;16(44):34-35
- 6 Campo L, Turley H, Han C, *et al.* Angiogenin is up - regulated in the nucleus and cytoplasm in human primary breast carcinoma and is associated with markers of hypoxia but not survival. *J Patholog* 2005;205

(5):585-591

- 7 周赛君,于珮,于德民,等. 高糖对 RF/6A 细胞内 PI3K-Akt 信号通路的影响. 中华临床医师杂志(电子版) 2012;6(4):928-931
- 8 于珮,于德民,齐建成,等. 高糖对 PI3K-Akt 信号传导途径及内皮细胞增殖的影响. 天津医药 2007;35(11):807-810
- 9 李志英,余杨桂. 糖尿病中医证型与糖尿病视网膜病变分期关系的探讨. 中国中医眼科杂志 2000;10(1):29-32
- 10 段俊国,罗向霞,许国旺,等. DR 病情进展与阳虚病机关系的研究. 西部中医药 2013;26(8):1-4
- 11 罗向霞. 糖尿病视网膜病变病情进展与阳虚病机的相关性及其代谢组学研究. 成都中医药大学 2008
- 12 管华全,樊巧玲. “阴中求阳”配伍补阴药规律探讨. 陕西中医学院学报 2010;33(6):101-102
- 13 王秀凤,李静,张磊,等. 基于方差分析的肾气丸、右归丸、右归饮 3 首补肾阳类方配伍规律研究. 辽宁中医杂志 2012;39(5):774-776
- 14 刘志龙,陈威妮. 从阳虚论治消渴病初探. 新中医 2009;41(3):109-110
- 15 南征,高彦彬,钱秋海. 糖尿病中西医结合治疗. 北京:人民卫生出版社 2002;113
- 16 田红军,曹清慧,高桂君. 浅谈温阳法在糖尿病及其并发症中的应用. 河北中医 2010;32(12):1811-1812
- 17 刘文华. 糖尿病性视网膜病变的病因及分型论治探讨. 国医论坛 2001;16(3):15-16
- 18 谷雨明,黄延芹,徐云生. 现代中医治疗糖尿病的辨证体系研究进展. 河北中医 2015; 37(10):1587-1589