

# 胰岛素对糖尿病小鼠缺血诱导的血管新生障碍的影响

董莉, 刘莹, 沈宇, 陈琴, 白剑, 徐标

(南京大学医学院附属鼓楼医院心脏科, 江苏省南京市 210008)

[关键词] 糖尿病; 血管新生; 血管内皮生长因子; 胰岛素

[摘要] 目的 观察糖尿病小鼠是否存在缺血诱导的血管新生障碍, 以及胰岛素治疗对这种障碍的影响, 并探讨其可能的分子机制。方法 链脲霉素诱导 C57BL/6 雄鼠糖尿病, 非糖尿病组给予等量缓冲液, 糖尿病胰岛素治疗组术前及术后注射胰岛素控制血糖。左侧股动脉高位结扎离断造成单侧后肢缺血模型。ELISA 法测定术前及术后 (1、3、7 及 14 天) 血浆血管内皮生长因子 (VEGF) 及间充质衍生因子 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) 水平。CD31 免疫组织化学染色法评估术前及术后 (7、14 天) 双侧后肢血管新生情况。免疫印迹法测定腓肠肌组织血管内皮生长因子、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)、蛋白激酶 B (Akt) 及其磷酸化产物的蛋白表达。结果 与非糖尿病组比较, 糖尿病组小鼠缺血组织新生毛细血管密度显著减少 (术后 7 天  $7.65 \pm 1.74$  比  $18.22 \pm 3.77$ ,  $P < 0.05$ ), 并伴随缺血诱导的血浆血管内皮生长因子及间充质衍生因子 1 $\alpha$  释放受抑 ( $P < 0.01$ ), 靶组织血管内皮生长因子蛋白表达上调受抑, 蛋白激酶 B 及内皮型一氧化氮合酶磷酸化减弱 ( $P < 0.05$ )。胰岛素治疗明显改善糖尿病动物组织缺血后血管新生程度 ( $15.36 \pm 2.14$  比  $7.65 \pm 1.74$ ,  $P < 0.05$ ), 提高血浆血管内皮生长因子及间充质衍生因子 1 $\alpha$  释放水平 ( $P < 0.01$ ), 并增强缺血组织血管内皮生长因子及其下游信号分子的表达与活化 ( $P < 0.05$ )。结论 胰岛素治疗有效改善糖尿病动物缺血诱导的血管新生障碍, 其可能是通过恢复受损的 SDF-1/VEGF/Akt/eNOS 信号通路活化而介导。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Insulin on Impaired Ischemia-Induced Neovascularization in Diabetic Mice

DONG Li, LIU Ying, SHEN Yu, CHEN Qin, BAI Jian, and XU Biao

(Department of Cardiology, Drum Tower Hospital Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008, China)

[KEY WORDS] Diabetes Mellitus; Neovascularization; Vascular Endothelial Growth Factor; Insulin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether ischemia-induced neovascularization is impaired in diabetic mice and the effect of insulin administration on this dysfunction and the underlying mechanisms. **Methods** Unilateral hindlimb ischemia was performed in streptozotocin-induced diabetic mice (C57BL/6) by left femoral artery ligation. The plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) and stroma-derived growth factor 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) levels were measured by ELISA before ligation and 1, 3, 7, 14 days after ischemia. Capillary density was determined in both ischemic and non-ischemic gastrocnemius muscles by CD31 staining. The local expressions of VEGF, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), phospho-eNOS, protein kinase B (PKB, Akt) and phospho-Akt were quantified by Western blotting. **Results** After ischemia, diabetic mice showed abrogated capillary density increase in the ischemic tissue compared with non-diabetic mice (day 7:  $7.65 \pm 1.74$  vs  $18.22 \pm 3.77$ ,  $P < 0.05$ ), which were accompanied by impeded release of plasma VEGF and SDF-1 $\alpha$  ( $P < 0.01$ ), and impaired upregulation of local VEGF protein expression as well as Akt and eNOS phosphorylation ( $P < 0.05$ ). Insulin administration significantly ameliorated ischemia-induced angiogenesis in treated compared with non-treated diabetic groups ( $15.36 \pm 2.14$  vs  $7.65 \pm 1.74$ ,  $P < 0.05$ ), elevated plasma levels of VEGF and SDF-1 $\alpha$  ( $P < 0.01$ ), as well as enhanced local VEGF expression and Akt/eNOS phosphorylation ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The data suggested that insulin administration efficiently improved impaired ischemia-induced neovascularization in diabetic mice which may be attributed to restoration of attenuated SDF-1 $\alpha$ /VEGF/Akt/eNOS activation.

糖尿病患者易患心肌梗死、缺血性脑卒中、下肢动脉闭塞等血管并发症, 发生缺血事件后预后往往较差, 其发病机制在很大程度上与糖尿病组织供

血动脉闭塞后、反应性血管新生及侧支形成障碍有关<sup>[1]</sup>。然而阻碍糖尿病患者缺血组织再血管化的具体机制目前尚不明了。新近研究报导, 缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 介导的间充质衍生因子 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) 血管内皮生长因子 (VEGF) /蛋白激酶 B (Akt) /内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 信号通路在组织缺血损伤后的内皮修复及血管新生过程中发挥重要作用<sup>[2-5]</sup>。本研究利用糖尿病小鼠急性单侧后肢缺血模型, 观察糖尿病动物是否存在缺血诱导的血

[收稿日期] 2010-07-26 [修回日期] 2010-09-07

[基金项目] 国家自然科学基金 (30170370); 江苏省医学重点人才资助项目 (2008)

[作者简介] 董莉, 博士研究生, 主治医师, 主要从事心血管疾病发病机制的研究, Email 为 dongli\_nj@163.com。通讯作者徐标, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, Email 为 xubiao@medmail.com.cn。

管新生障碍, 以及胰岛素治疗对这种障碍的影响, 并探讨其可能的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 糖尿病模型的建立

C57BL/6小鼠(购自南京大学模式动物研究所)8周龄, 随机分为非糖尿病组、糖尿病组和糖尿病胰岛素治疗组(胰岛素组)3组, 每组30例。参照文献[6]腹腔注射40 mg/kg链脲霉素(Sigma公司)建立糖尿病模型。非糖尿病组腹腔注射等量柠檬酸钠缓冲液。胰岛素组参照文献[7]于手术前皮下注射10 U/kg Novolin R(Novo Nordisk公司)纠正高血糖, 术后每日注射50 U/kg Lantus(SanofiAventis公司)以维持血糖控制在11.1 mmol/L以下, 直至各时间点处死动物。

### 1.2 后肢缺血模型的建立

入组小鼠饲养2个月后, 参照文献[5]在立式显微镜下行左侧股动脉及其大分支结扎离断术, 建立急性单侧后肢缺血模型。通过红四氮唑染色和后肢血管造影评估手术效果。

### 1.3 血浆血管内皮生长因子和间充质衍生因子-1 $\alpha$ 水平测定

于术前及术后不同时间点(1、3、7及14天)采血, ELISA法检测血浆VEGF及SDF-1 $\alpha$ 水平, 操作按照检测试剂盒(R&D公司)说明书进行。

### 1.4 毛细血管密度计数

于术前、术后7天及术后14天处死动物, 游离双侧腓肠肌。参照文献[8], CD31免疫组织化学染色法进行腓肠肌组织毛细血管密度计数。

### 1.5 肌肉组织VEGF、Akt磷酸化Akt、eNOS及磷酸化eNOS蛋白表达水平测定

参照文献[8], 免疫印迹法测定腓肠肌组织上述蛋白表达水平。组织匀浆沉淀用含蛋白酶抑制剂(SigmaAldrich公司)及磷酸酶抑制剂(Roche公司)的组织细胞裂解液提取细胞膜总蛋白, Bradford法

定量。取100  $\mu$ g总蛋白变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 湿性电转法将分离的蛋白转移至PVDF膜上, 转移蛋白膜条以5%脱脂牛奶封闭后与一抗4℃过夜孵育[羊抗小鼠VEGF多克隆抗体1:400(Santa Cruz公司), 兔抗小鼠Akt及磷酸化Akt(Ser473)单克隆抗体1:2000(Eptomics公司), 小鼠抗小鼠eNOS及磷酸化eNOS(Ser1177)单克隆抗体1:500(BD公司), 小鼠抗小鼠磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase GAPDH)单克隆抗体1:4000(Cell Signaling公司)], 孵育结束后以PBST充分洗涤, 之后与相应的二抗室温孵育2 h。免疫反应结束后ECL法显影, 用Quantity One图象分析软件分析目标条带的光密度值, 将待测蛋白条带与同一泳道GAPDH条带的光密度比值作为结果。

### 1.6 统计学分析

应用SPASS 11.0软件进行统计学分析, 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数间比较采用 $t$ 检验, 多组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 小鼠基本生理情况

入组时3组间小鼠体重和血糖差异无统计学意义。术后处死时, 糖尿病组平均血糖约是非糖尿病组的3倍( $P < 0.01$ ), 而体重则较非糖尿病组降低约20%( $P < 0.01$ )。胰岛素组血糖下降( $P < 0.01$ ), 接近正常, 术后1周处死时体重较非治疗糖尿病组有所增加(表1)。

### 2.2 缺血模型评估

左侧股动脉及其大分支结扎离断后因组织缺血线粒体损伤, 红四氮唑试验不能产生有效染色反应而呈现白色(图1)。后肢血管造影可见右股动脉及其大分支显影清晰, 而左侧未见大血管及其分支显影(图1)。

表1 C57BL/6小鼠一般情况( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 30$ )

分 组	体重(g)			血糖(mmol/L)		
	实验前	手术前	处死前	实验前	手术前	处死前
非糖尿病组	25.0 $\pm$ 1.1	31.5 $\pm$ 2.5	29.6 $\pm$ 2.0	6.7 $\pm$ 0.9	6.7 $\pm$ 1.6	6.8 $\pm$ 2.5
糖尿病组	25.2 $\pm$ 1.3	26.2 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>	23.3 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	6.7 $\pm$ 1.1	20.4 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	20.5 $\pm$ 5.6 <sup>a</sup>
胰岛素组	25.1 $\pm$ 1.2	25.9 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	26.9 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>	6.8 $\pm$ 0.6	19.9 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	7.9 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>

a为 $P < 0.01$ , 与非糖尿病组比较; b为 $P < 0.01$ , 与糖尿病组比较。

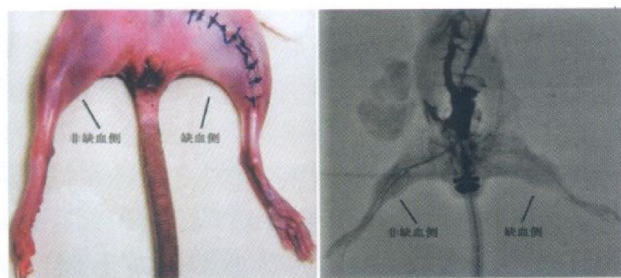


图 1 缺血模型评估 左为 TTC 染色试验, 右为后肢血管造影。

### 2.3 胰岛素治疗改善糖尿病小鼠组织缺血诱导的血管新生障碍

非糖尿病小鼠缺血侧腓肠肌毛细血管密度在术后 3 天即较基线明显增加, 7 天时增长速度达到高峰, 14 天后趋于平稳。术后 7 天时非糖尿病组缺血

侧腓肠肌毛细血管密度较非缺血侧增加 2.04 倍 ( $18.22 \pm 3.77$  比  $8.92 \pm 2.58$ ,  $P < 0.05$ ), 与术前比较差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 糖尿病组缺血侧腓肠肌毛细血管密度则无明显变化 ( $7.65 \pm 1.74$  比  $7.05 \pm 1.26$ ,  $P > 0.05$ ), 与非糖尿病组比较显示其血管新生障碍 ( $P < 0.05$ ); 而胰岛素组缺血肢体新生毛细血管密度增加 1.90 倍 ( $15.36 \pm 2.14$  比  $8.07 \pm 1.96$ ,  $P < 0.05$ ), 与非治疗糖尿病组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2 和表 2)。尽管术后 14 天时糖尿病组缺血后肢毛细血管密度较非缺血侧增加 1.52 倍, 但与非糖尿病组 (2.43 倍) 及胰岛素治疗组 (2.24 倍) 比较, 其血管新生程度仍明显降低 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

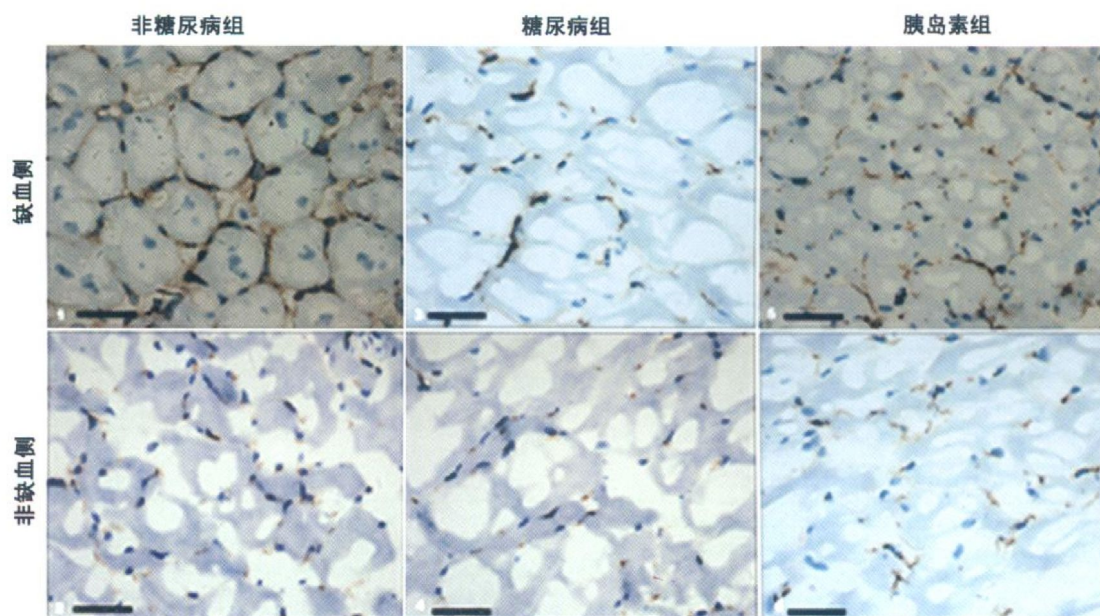


图 2 缺血后 7 天腓肠肌组织血管新生情况 CD31 免疫组织化学染色 ( $\times 400$ )。

表 2 小鼠腓肠肌缺血侧/非缺血侧毛细血管密度比值 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

分 组	术前	术后 7 天	术后 14 天
非糖尿病组	$1.02 \pm 0.15$	$2.04 \pm 0.17^a$	$2.43 \pm 0.24^a$
糖尿病组	$0.97 \pm 0.05$	$1.03 \pm 0.13^b$	$1.52 \pm 0.16^{ac}$
胰岛素组	$0.98 \pm 0.10$	$1.90 \pm 0.20^{ac}$	$2.24 \pm 0.20^{ac}$

a 为  $P < 0.01$ , 与术前比较; b 为  $P < 0.05$  与非糖尿病组比较; c 为  $P < 0.05$  与糖尿病组比较。

### 2.4 胰岛素治疗改善糖尿病小鼠缺血诱导的血浆血管内皮生长因子及间充质衍生因子-1 $\alpha$ 释放受抑

缺血术后非糖尿病组血浆 VEGF 及 SDF-1 $\alpha$  水

平均快速升高, 在术后 3 天达到高峰 ( $P < 0.01$ ), 之后 VEGF 水平迅速回落, 至术后 7 天时接近基线水平, SDF-1 $\alpha$  则缓慢下降, 持续两周维持于较低水平。而糖尿病组缺血早期血浆 VEGF 及 SDF-1 $\alpha$  的释放水平较非糖尿病组显著减少 ( $P < 0.01$ )。胰岛素治疗明显改善糖尿病缺血诱导的血浆 VEGF 及 SDF-1 $\alpha$  释放受抑, 术后 3 天时胰岛素组血浆 VEGF 水平较糖尿病非治疗组升高 1.6 倍 ( $P < 0.01$ ), 而 SDF-1 $\alpha$  水平亦有 1.33 倍升高 ( $P < 0.01$ ), 并在术后 14 天内持续高于糖尿病组水平, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 3)。



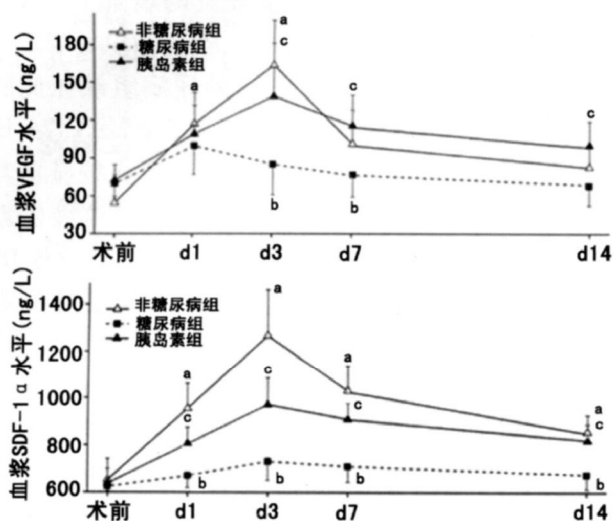


图 3 组织缺血后不同时间血浆血管内皮生长因子及间质衍生因子-1 $\alpha$ 浓度变化情况。a为 $P < 0.01$ 与术前比较; b为 $P < 0.01$ 与非糖尿病组比较; c为 $P < 0.01$ 与糖尿病组比较。

## 2.5 胰岛素治疗改善糖尿病小鼠缺血组织 VEGF/Akt/eNOS信号通路活化障碍

股动脉结扎离断术后 1 周, 3 组小鼠非缺血侧肌肉组织 VEGF 蛋白、Akt 及 eNOS 磷酸化产物的表

达很少, 各组间比较差异无统计学意义。在缺血侧, 非糖尿病组腓肠肌组织 VEGF 蛋白表达明显上调, 并伴随 Akt 及 eNOS 蛋白磷酸化增强; 而糖尿病组缺血组织 VEGF、磷酸化 Akt 及磷酸化 eNOS 的表达较非糖尿病组显著减少 ( $P < 0.05$ )。胰岛素治疗有效增加糖尿病小鼠组织缺血诱导的 VEGF 蛋白表达水平, 并增强 Akt 及 eNOS 蛋白磷酸化 ( $P < 0.05$ , 图 4 和表 3)。

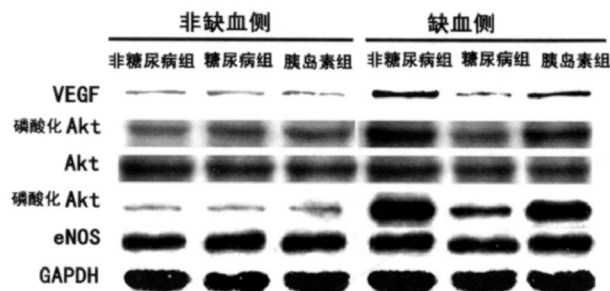


图 4 缺血后 7 天腓肠肌组织血管内皮生长因子、蛋白激酶 B 及一氧化氮合酶的蛋白表达与活化。

表 3 小鼠缺血侧腓肠肌组织信号分子蛋白表达与活化 /GAPDH ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

分 组	VEGF	eNOS	磷酸化 eNOS	Akt	磷酸化 Akt
非糖尿病组	0.35 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.11	0.42 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.08
糖尿病组	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.48 $\pm$ 0.12	0.32 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.30 $\pm$ 0.10	0.18 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
胰岛素组	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.56 $\pm$ 0.09	0.74 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.36 $\pm$ 0.12	0.60 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>

a为 $P < 0.05$ 与非糖尿病组比较; b为 $P < 0.05$ 与糖尿病组比较。

## 3 讨论

本研究利用小剂量 STZ 连续腹腔注射法建立了实验性糖尿病小鼠模型, 通过股动脉结扎离断术成功造成单侧后肢急性严重缺血, 并观察到糖尿病动物缺血肢体的血管新生程度较非糖尿病组明显减低, 能够模拟出临床上糖尿病患者急性组织缺血后的血管新生障碍。本研究更为重要的发现是, 组织缺血后非糖尿病小鼠血浆促血管生成因子 SDF-1 $\alpha$  及 VEGF 快速释放, 并伴随着缺血组织 VEGF 蛋白表达增加、其下游信号分子 Akt 及 eNOS 磷酸化增强, 而糖尿病组缺血诱导的血浆 SDF-1 $\alpha$  及 VEGF 上调显著受抑, 其靶组织 VEGF/Akt/eNOS 信号通路活化受损, 这可能是阻碍糖尿病动物缺血后代偿性血管新生的重要机制。

缺血损伤发生后, 损伤部位 HIF-1 $\alpha$  及 SDF-1 $\alpha$

生成增加<sup>[2,3]</sup>。HIF-1 $\alpha$  作为 VEGF 的转录活化因子, 进一步上调缺血组织 VEGF 的表达与释放。增多的 VEGF 与细胞表面受体结合后进而激活磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)/Akt 信号通路, 活化的蛋白激酶 Akt 介导 eNOS 丝氨酸磷酸化, 使 eNOS 酶活性增强, 促进血管内皮合成与释放 NO<sup>[4]</sup>。SDF-1 $\alpha$  亦可通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路活化机制介导 VEGF 合成、Akt/eNOS 磷酸化、NO 释放增加, 进而增加局部血流、修复损伤内皮、诱导血管新生及侧支形成<sup>[8]</sup>。然而糖尿病状态下生成增加的活性氧簇以及高血糖的直接毒性作用可导致 HIF-1 $\alpha$  表达减少、降解增加, 继而 SDF-1 $\alpha$ 、VEGF 释放减少, 其下游信号分子活化受抑, NO 生物利用度降低, 从而造成血管舒张功能障碍, 内皮细胞凋亡加速、增殖与迁移受抑<sup>[7,9,10]</sup>。

随着骨髓起源内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell EPC) 的发现, 人们逐渐认识到成体血管新生不仅依赖于原位血管成熟内皮细胞的芽生, 循环中的 EPC 也积极参与各种生理及病理状态下的血管新生以及损伤内皮的修复<sup>[6 8 11]</sup>。现已明确, 缺氧上调的 SDF-1 及 VEGF 促进骨髓 EPC 动员、归巢至缺血组织或损伤血管, 在缺血损伤部位, 活化的 SDF-1 $\alpha$ /VEGF/Akt/eNOS 通路信号分子诱导归巢的 EPC 粘附分化、增殖存活、迁移并整合生成新生血管<sup>[4 8]</sup>。而糖尿病患者及糖尿病动物缺血损伤后骨髓 EPC 动员障碍<sup>[5 12]</sup>, 同时 EPC 参与血管形成等功能存在严重缺陷<sup>[6 7]</sup>。推测糖尿病状态下缺血诱导的 SDF-1 $\alpha$  及 VEGF 信号通路活化受损可能是其功能障碍的关键因素之一。

本研究进一步应用胰岛素治疗纠正高血糖, 观察糖尿病小鼠组织缺血后血管新生变化。实验发现, 胰岛素治疗可明显增加缺血诱导的循环中 SDF-1 $\alpha$  及 VEGF 释放水平, 恢复缺血组织 VEGF/Akt/eNOS 信号通路活化, 并增强局部代偿性血管新生。推测其一方面可能是通过胰岛素直接与 VEGF 启动子相互作用而增强缺血组织 VEGF 的表达<sup>[13 14]</sup>。另一方面, 胰岛素可通过其受体介导 PI3K/Akt/eNOS 信号通路激活<sup>[15 16]</sup>。此外, 胰岛素治疗降低高血糖, 可减轻氧化应激, 恢复糖尿病小鼠缺血诱导的 HIF-1 $\alpha$ -SDF-1/VEGF 系统活化, 从而改善内皮修复功能及反应性血管新生。

#### [参考文献]

- [1] Wallenberger J. Impaired collateral vessels development in diabetes potential cellular mechanisms and therapeutic implications [J]. *Cardiovasc Res* 2001; **49** (3): 554-560
- [2] Lee SH, Wolf PL, Escudero R, et al. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction [J]. *N Engl J Med*

- 2000; **342**: 626-633
- [3] Ceradini DJ, Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue [J]. *Trend Cardiovasc Med* 2005; **15** (2): 57-63
- [4] Hur J, Yoon CH, Lee CS, et al. Akt is a key modulator of endothelial progenitor cell trafficking in ischemic muscle [J]. *Stem Cell* 2007; **25** (7): 1769-778
- [5] 康丽娜, 徐标, 陈琴, 等. 糖尿病小鼠缺血诱导的骨髓内皮祖细胞动员障碍 [J]. *中华心血管病杂志*, 2007; **35**: 513-516
- [6] Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, et al. Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment [J]. *Am J Pathol* 2004; **164**: 457-466
- [7] Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats [J]. *Diabetologia* 2006; **49**: 3075-084
- [8] Hasa SK, Ishibashi M, Ohtani K, et al. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway [J]. *Circulation* 2004; **109**: 2454-461
- [9] Catrina SG, Okamoto K, Pereira T, et al. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein stability and function [J]. *Diabetes* 2004; **53**: 226-232
- [10] Xu R, Chibber R, Ruggiero D, et al. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products [J]. *FASEB J* 2003; **17**: 1289-291
- [11] 赵薇, 杨向红. 内皮祖细胞在治疗性血管新生中的应用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14** (12): 1090-093
- [12] 王昆, 康丽娜, 王涟, 等. 急性心肌梗死伴 2 型糖尿病患者内皮祖细胞动员障碍 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (5): 829
- [13] Bemont L, Lamielle F, Lorchel F, et al. Insulin up-regulates vascular endothelial growth factor and stabilizes its messengers in endometrial adenocarcinoma cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86** (1): 363-368
- [14] He ZH, Opland DM, Way KJ, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression and vascularization in the myocardium by insulin receptor and p3k/akt pathways in insulin resistance and ischemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26** (4): 787-792
- [15] Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo [J]. *Circulation* 2000; **101**: 676-681
- [16] Montagnani M, Chen H, Barr V A, et al. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of  $Ca^{2+}$  but requires phosphorylation by akt at ser1179 [J]. *J Biol Chem* 2001; **276** (32): 30392-398

(此文编辑 李玲玲)