

益气养阴方对糖尿病性脑内微小病变实验大鼠的保护作用*

赵雅洁¹, 刘笑迎^{2△}, 曹 贺³, 游 毅²

(1. 上海交通大学医学院附属第一人民医院, 上海 200080;

2. 上海中医药大学附属上海市中西医结合医院, 上海 200011; 3. 上海市杨浦区中医医院, 上海 200090)

摘要: **目的** 观察益气养阴方对糖尿病性脑内微小病变大鼠治疗效果。**方法** 建立大鼠糖尿病性脑内微小病变模型,将动物分为正常对照组、高糖损伤组、阿司匹林对照组、中药组,通过生化、流式细胞仪(PI)测定等方法检测大鼠脑内微小病变的变化;通过 Real time PCR、Western blot 测定 HIF-1 α 的变化。**结果** 糖化血红蛋白及流式细胞结果提示,与高糖损伤组相比,阿司匹林组、中药组糖化血红蛋白、凋亡率都有所减少,且各组之间相比有明显统计学差异($P<0.05$)。与阿司匹林组相比,中药组糖化血红蛋白表达量有所增加($P<0.05$)。与阿司匹林组相比,中药组早期凋亡率所增加,但无明显统计学意义($P>0.05$);中药组晚期凋亡率所增加且有统计学意义($P<0.05$);与阿司匹林组相比,中药组 HIF-1 α mRNA 及蛋白表达量有所增加($P<0.05$)。Real time PCR、Western blot 测定 HIF-1 α 的变化发现,与高糖损伤组相比,阿司匹林、中药组、HIF-1 α mRNA 及蛋白表达量都有所减少($P<0.05$),且各组之间相比有明显统计学差异($P<0.05$),与阿司匹林组相比,中药组 HIF-1 α mRNA 及蛋白表达量有所增加($P<0.05$)。**结论** 益气养阴方对糖尿病性脑内微小病变的治疗具有一定的作用,可降低糖化血红蛋白吸光度,降低脑神经细胞凋亡率,降低 HIF-1 α 的表达,相对于阿司匹林的治疗作用有一定差别。

关键词: 脑内微小病变;糖尿病大鼠;益气养阴方;HIF-1 α

中图分类号: R259; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2023)02-0080-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2023.02.016

Protective Effect of Yin-Nourishing Therapy of Traditional Chinese Medicine on Experimental Rats with Diabetic Encephalopathy

ZHAO Yajie¹, LIU Xiaoying², CAO He³, YOU Yi²

(1. Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China;

2. Shanghai Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200011, China;

3. Shanghai Yangpu District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200090, China)

ABSTRACT: Objective To observe the therapeutic effect of Yiqi Yangyin Recipe on diabetic intracerebral microlesions in rats. **Methods** The model of diabetic intracerebral microlesions in rats was established. The animals were divided into normal control group, high glucose injury group, aspirin control group and traditional Chinese medicine group. The changes of intracerebral microlesions in rats were detected by biochemistry and flow cytometry (PI), and the changes of HIF-1 α were detected by Realtime PCR and Western blot. **Results** The results of glycated hemoglobin and flow cytometry showed that compared with the high glucose injury group, the glycated hemoglobin and apoptotic rate of aspirin group and traditional Chinese medicine group decreased, and there was significant difference among the groups ($P<0.05$). Compared with aspirin

收稿日期: 2022-11-22

* **基金项目:** 上海市科学技术委员会引导类课题(16401931600);上海市虹口区卫生健康委员会中医药科研课题(HKQ-ZYY-2020-11);上海市虹口区卫生健康委员会中医药科研课题(HKQ-ZYY-2020-18);上海市科委课题(202040408)

第一作者简介: 赵雅洁(1970-),女,脑电图技师,研究方向:脑电图、癫痫、脑血管病。

Δ 通信作者: 刘笑迎, E-mail: liuxiaoying2005@126.com

group, the expression of glycosylated hemoglobin in traditional Chinese medicine group increased ($P<0.05$). Compared with aspirin group, the early apoptotic rate of Chinese herbal medicine group increased, but there was no significant difference ($P>0.05$); the late apoptotic rate of Chinese herbal medicine group increased with statistical significance ($P<0.05$); compared with aspirin group, the expression of HIF-1 α in Chinese herbal medicine group increased ($P<0.05$). Realtime PCR and Western blot showed that the expression of HIF-1 α in aspirin, traditional Chinese medicine and HIF-1 α decreased compared with the high-glucose injury group ($P<0.05$), and there were significant differences among the groups ($P<0.05$). Compared with aspirin group, the expression of HIF-1 α in traditional Chinese medicine group increased ($P<0.05$). **Conclusion** Yiqi Yangyin Recipe has a certain effect on the treatment of diabetic encephalopathy. It can reduce the absorbance of glycosylated hemoglobin, the apoptotic rate of brain neurons and the expression of HIF-1 α . The therapeutic effect of aspirin is different from that of aspirin.

KEY WORDS: cerebral microlesions; diabetic rats; Yiqi Yangyin Recipe; HIF-1 α

糖尿病性脑内微小病变,是由长期糖尿病导致的并发症,病人主要病因为“消渴”,主要病机为本虚标实,本虚在于气阴不足,阴精亏损,标实在于瘀血阻滞。而糖尿病性脑内微小病变的发展变化,也符合络病的传变特点,具有时间性,局部性与广泛性,功能失常为主导,难治性和缠绵性,进展性,复发性。提示治疗糖尿病性脑内微小病变应当持之以恒,缓以图之。因此,虽然脑内微小病变尚无脑卒中先兆的表现,我们在原理上也可以将其视为“中风先兆”的一种无表现型,治疗上可以参照“中风先兆”。本实验以此为依据,对糖尿病性脑内微小病变模型大鼠进行治疗并评估治疗效果。

1 材料和方法

1.1 材料与方法

1.1.1 实验动物及试剂

健康雄性1月龄Wistar大鼠,由上海中医药大学试验动物中心提供,体质量80~90 g。

1.1.2 实验造模

参照赵宝珍等改良的2型糖尿病模型建立方法,具体见参考文献[1]。

1.1.3 实验分组与药物制备

各组动物随机分为正常对照组(normal control, NC组);高糖损伤组(diabetes mellitus, DM组);阿司匹林对照组(aspirin control, AC组);中药组(traditional Chinese medicine, TCM组),6只/组。

中药组:养阴益气方(黄芪、丹参、山药、知母、黄柏、白芍)各10 g,加10倍水煎煮1 h,过滤,药渣加5倍水煎煮1 h,过滤,合并滤液,水浴浓缩至2 g生药/mL药液。

阿司匹林组:阿司匹林肠溶片,拜耳制药,大鼠灌胃给药体积为1 mL/kg。

1.1.4 实验方法

NC组、DM组造模完成后分别以生理盐水灌肠;AC组、TCM组造模完成后分别以阿司匹林片及中药灌肠。4组大鼠均在灌肠开始后第6月处死取材。

1.1.5 检测指标

(1)生化检测

每组大鼠按月抽取血液进行糖化血红蛋白检测。

(2)分子生物学检测

标本处理:分别于相应的观察时间点给大鼠腹腔注射10%水合氯醛,过量麻醉后处死,在无菌条件下切取大鼠脑组织,投入多聚甲醛中固定后用石蜡包埋。迅速放入液氮,继而转至-70℃冰箱冻存。

标本检测:各组均以流式细胞术观察细胞凋亡情况;RT-PCR荧光定量检测大鼠脑内组织HIF-1 α mRNA的表达;Western blot及免疫组化方法检测HIF-1 α 蛋白表达。

A. 凋亡率测定:使用流式细胞仪检测。试验重复3次。

B. HIF-1 α mRNA表达:采用Realtime PCR方法测定。引物序列为:

HIF-1 α mRNA

Primer F 5'-ACTATGTCGCTTTCTTGG-3'

Primer R 5'-TTTCTGCTGCCTTGATG-3'

Size: 194 bps

Gapdh mRNA

Primer F 5'-GGAGTCTACTGGCGTCTTCAC-3'

Primer R 5'-ATGAGCCCTTCCACGATGC-3'

Size: 237 bps

按说明书用Trizol提取总RNA,制作HIF-1 α /GAPDH的标准曲线,并进行Realtime PCR反应试验

重复 3 次。

C. HIF-1 α 蛋白的表达:采用 Western blot 测定,用 Lowry 法测定所收集的蛋白质含量,以 GAPDH 作内参。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后,以 TBS-T 洗膜 3 次,加入有辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗兔 IgG-HRP)室温孵育 1 h,以 TBS-T 洗膜 3 次,ECL 显色。膜经凝胶成像仪(Bio-rad)记录相应的表达量。实验重复 3 次。

1.2 统计分析

所得数据均用 SPSS 20.0 软件进行统计处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布者,各组间均数差异用方差分析,双侧检验, $P < 0.05$ 认为有统计学差异;非正态分布者,用秩和检验, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 生化检测 与高糖损伤组相比,阿司匹林、中药组每 10 g 血红蛋白吸光度表达量都有所减少,且各组之间相比有明显统计学差异($P < 0.05$),与阿司匹林组相比,中药组糖化血红蛋白吸光度表达量有所增加($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 糖化血红蛋白吸光度的组间比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	糖化血红蛋白吸光度
正常对照组	6	1.26 $\pm$ 0.17
高糖损伤组	6	5.35 $\pm$ 0.19 $^{\Delta}$
阿司匹林组	6	2.63 $\pm$ 0.10 $^{\Delta\Delta}$
中药组	6	3.48 $\pm$ 0.22 $^{\Delta\Delta*}$

注:vs 正常对照组, $^{\Delta}P < 0.05$;vs 高糖损伤组, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$;vs 阿司匹林组, $^*P < 0.05$ 。

2.2 细胞凋亡率检测 由早期凋亡率结果可以看出,与正常对照组相比高糖损伤组凋亡量明显增加($P < 0.05$),与高糖损伤组相比,阿司匹林、中药组凋亡都有所减少($P < 0.05$),且各组之间相比有明显统计学差异($P < 0.05$),与阿司匹林组相比,中药组凋亡率所增加,但无明显统计学意义($P > 0.05$)。见表 2、图 1。

由晚期凋亡率结果可以看出,与正常对照组相比高糖损伤组凋亡量明显增加($P < 0.05$),与高糖损伤组相比,阿司匹林、中药组凋亡都有所减少($P < 0.05$),且各组之间相比有明显统计学差异($P < 0.05$),与阿司匹林组相比,中药组凋亡率所增加($P < 0.05$),说明该中药对晚期凋亡抑制较早期差。见表 3、图 1。

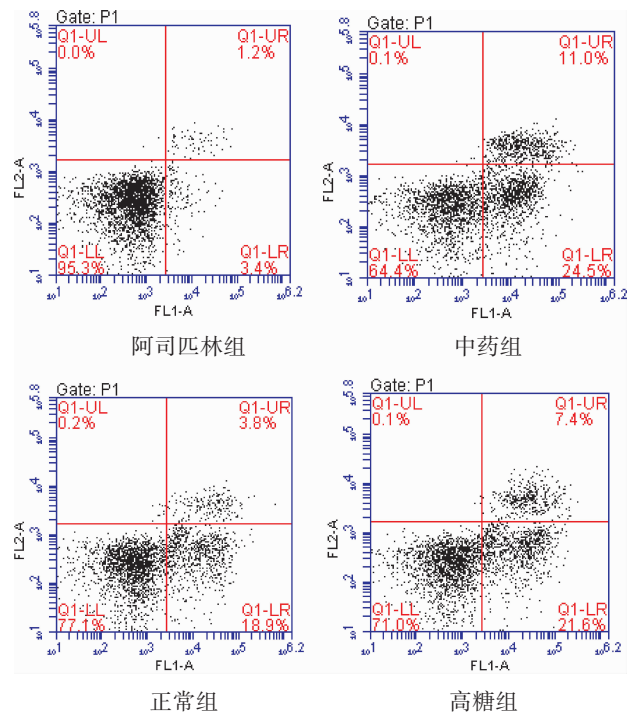


图 1 大鼠脑神经细胞凋亡率测定

表 2 大鼠脑神经细胞早期凋亡率测定($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	早期凋亡率
正常对照组	6	3.80 $\pm$ 0.36
高糖损伤组	6	25.13 $\pm$ 2.22 $^{\Delta}$
阿司匹林组	6	17.00 $\pm$ 1.90 $^{\Delta\Delta}$
中药组	6	20.50 $\pm$ 1.02 $^{\Delta\Delta*}$

注:vs 正常对照组, $^{\Delta}P < 0.05$;vs 高糖损伤组, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$;vs 阿司匹林组, $^*P < 0.05$ 。

表 3 大鼠脑神经细胞晚期凋亡率测定($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	晚期凋亡率
正常对照组	6	0.80 $\pm$ 0.36
高糖损伤组	6	9.90 $\pm$ 1.10 $^{\Delta}$
阿司匹林组	6	3.40 $\pm$ 0.53 $^{\Delta\Delta}$
中药组	6	6.30 $\pm$ 1.05 $^{\Delta\Delta*}$

注:vs 正常对照组, $^{\Delta}P < 0.05$;vs 高糖损伤组, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$;vs 阿司匹林组, $^*P < 0.05$ 。

2.3 HIF-1 α mRNA 表达 由 Realtime PCR 结果可以看出,与正常对照组相比高糖损伤组 HIF-1 α mRNA 表达量明显增加($P < 0.05$),与高糖损伤组相比,阿司匹林、中药组、HIF-1 α mRNA 表达量都有所减少($P < 0.05$),且各组之间相比有明显统计学差异($P < 0.05$)。

0.05),与阿司匹林组相比,中药组 HIF-1 α mRNA 表达量有所增加($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组 HIF-1 α mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	mRNA
正常对照组	6	0.00268 $\pm$ 0.00068
高糖损伤组	6	0.04484 $\pm$ 0.00203 $\blacktriangle$
阿司匹林组	6	0.01308 $\pm$ 0.00021 $\blacktriangle^{\Delta}$
中药组	6	0.02679 $\pm$ 0.00149 $\blacktriangle^{\Delta*}$

注:vs 正常对照组, $\blacktriangle P<0.05$;vs 高糖损伤组 $\Delta P<0.05$;vs 阿司匹林组, $*P<0.05$ 。

2.4 各组 HIF-1 α 蛋白表达情况 由 Western blot 结果可以看出,与正常对照组相比高糖损伤组 HIF-1 α 蛋白表达量明显增加($P<0.05$),与高糖损伤组相比,阿司匹林、中药组、HIF-1 α 蛋白表达量都有所减少($P<0.05$),且各组之间相比有明显统计学差异($P<0.05$),与阿司匹林组相比,中药组 HIF-1 α 蛋白表达量有所增加($P<0.05$)。见表 5,图 3。

表 5 各组 HIF-1 α 蛋白表达($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	蛋白
正常对照组	6	0.09067 $\pm$ 0.04310
高糖损伤组	6	0.57133 $\pm$ 0.09548 $\blacktriangle$
阿司匹林组	6	0.24667 $\pm$ 0.04359 $\blacktriangle^{\Delta}$
中药组	6	0.43133 $\pm$ 0.05897 $\blacktriangle^{\Delta*}$

注:vs 正常对照组, $\blacktriangle P<0.05$;vs 高糖损伤组, $\Delta P<0.05$;vs 阿司匹林组, $*P<0.05$ 。

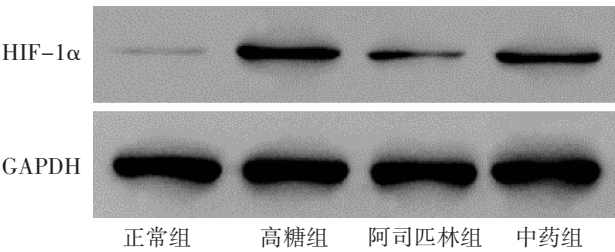


图 3 各组 HIF-1 α 蛋白表达

3 讨论

随着对脑血管疾病的发生及其危险因素研究的深入,脑卒中一级预防的重要性越来越被人们认识和重视。糖尿病是中风的重要危险因素之一。随着人们认识的提高,糖尿病的治疗和预防达到了一个新的水平。虽然部分患者的血糖在可控范围内,但还是无法

避免中风的发生。近年来,随着研究的不断深入,发现糖尿病脑内微小病变可以看作是糖尿病性脑血管病的早期表现^[2-4]。

糖尿病是中风和大脑发生微小变化的常见危险因素之一。预防大脑中的微小病变可以用“初级预防”指标、“预测因素”^[5]。这些认识符合中医学所倡导的“未病先防,既病防变”的理论。糖尿病脑血管病也是难以治疗和预防的疾病之一。糖尿病合并微小脑病变的西医治疗效果不佳,中医治疗的具体机制尚不明确;中药和方剂的选择也是有争议的^[6]。

脑内<3 mm 的微小病变使其患脑梗死及脑梗死相关死亡的风险增加至少 3 倍。Knopman 教授^[7]统计的 1 906 名志愿者中,从足够的脑 MRI 资料中发现,脑白质的微小梗死是脑血管事件隐匿进展的重要原因。可见,治疗脑内微小病变是否可以作为脑卒中的“一级预防”手段已成为人们关注的热点话题,而糖尿病是脑卒中与脑内微小病变的共同危险因素,糖尿病性脑血管病也是难治难防的疾病之一。对于糖尿病患者来说,通过预防糖尿病性脑内微小病变,进一步预防脑卒中,是十分必要而可行的。基于这一现状,充分发挥中医药的优势和特点,结合中医药“络病论”“扭转论”等理论,提出并实施了“养阴截断疗法”等理论^[8-9]。我们的实验采用益气养阴法治疗糖尿病性脑内微小病变取得一定疗效。

缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)是迄今为止发现的唯一能在特异性缺氧状态下发挥活性的转录因子,对细胞缺氧起稳定作用,是缺氧或某些氧化应激状态下产生的诱导低氧基因和修复细胞内环境的调节因子,是依赖氧浓度调节的主要因子,对周围氧环境具有较强敏感性^[10-13]。其在哺乳动物和人体广泛存在,直接或间接调节着血管生成、细胞增殖与凋亡、能量调节等众多通路^[14]。国内外有诸多学者用不同的方法不同的动物证明^[7]缺氧时 HIF-1 α 表达增高。

脑内微小病变中医并没有明确记载,但根据其表现,MRI-T2WI 的主要病理变化为游离水(H⁺)和亚急性性血肿^[15],可归于中医的“有形之邪”范畴。中医一般将有形之邪归结为血瘀、痰湿等病理产物,所以微小病变可以理解为痰湿、血瘀等阻滞脑络,产生小“症”“癥瘕”。“无症状、无征兆”——“中风”的“症状”虽然

没有出现,但在“病”中,借助现代医学手段,已经可以看出实实在在的弊端。它符合现代中医的“络病论”^[16]理论。

益气养阴方由黄芪、丹参、山药、知母、黄柏、白芍组成,采用益气养阴来治疗糖尿病性脑内微小病变。追溯治疗“中风病”理论源流,有关阴精亏虚与中风先兆的关系,明代张景岳在《景岳全书·非风》中曾指出:“……多以素不能慎,或七情内伤,或酒色过度,先伤五脏之真阴。”其病机为“阴亏于前,而阳损于后;阴陷于下,而阳泛于上,以致阴阳相失,精气不交,所以忽而昏馈,卒然仆倒……”此后,叶天士承前启后进一步阐明了肾精亏虚、收纳无权是中风先兆致病因素之一,他说:“肾阴弱,收纳无权,肝阳炽,虚风蒙窍。”又说:“精血衰耗,水不涵木,木少滋荣,故肝阳偏亢。”进一步导致“内风旋动”,其表现为上实(脉弦动、眩晕、耳聋)、下虚(下肢无力)等肾虚欲仆之症。针对这一病理特点,叶天士采用填补真阴法来截断中风的发生,既可补其不足,又可截断病变之发展,疗效显著。叶天士在《临证指南医案·中风》32 案中有关中风先兆的医案就有 5 案。这是叶天士继《内经》《难经》《伤寒论》之后,运用中医“治未病”这一最高治疗原则,采用“养阴截断疗法”,论治中风先兆的独特经验,实践证明,叶天士对中风先兆的防治经验至今对预防中风仍有较高的实用价值。这又正好与我们研究的糖尿病性脑内微小病变,糖尿病体质的病人阴精多不足的理论吻合。

本方中黄芪味甘,性微温,针对糖尿病并发症的“虚”证病机,具有益气养元,扶正祛邪,补气升阳、通经脉的功效。临床及药理研究表明,黄芪具有调节内皮细胞一氧化氮水平,调节血管生长因子 VEGF 表达,降糖及抗脂质过氧化的作用。丹参味微苦,性微寒,针对糖尿病并发症,具有活血化瘀,通利经络的作用。现代研究表明,它具有调节细胞 VEGF 表达,抗内皮细胞细胞凋亡的作用,此外还具有一定降血糖作用。山药味甘,性平,具有益气养阴,治本的作用。现代药理研究也表明山药具有滋补、降血糖等重要作用。我们先期临床和动物实验研究发现以黄芪、山药、丹参为君药的方剂能改善糖尿病的周围神经症状;体外实验也发现黄芪、丹参^[9]对内皮细胞^[17-18]损伤有保护作用;地龙性寒,味咸,具有溶解血栓、激活纤溶酶原、抑制血小板聚集、降低血脂等作用^[19]。许多临床研究

结果也表明地龙治疗脑卒中有效。我们利用其消癥通络的作用机理,将其^[20-22]应用于脑内微小病变并取得了良好的疗效。

本实验提示益气养阴方对糖尿病性脑内微小病变的治疗具有一定的作用,可降低糖化血红蛋白吸光度,降低脑神经细胞凋亡率,此外我们还发现,本方可降低 HIF-1 α 的表达。HIF-1 α 是缺氧或某些氧化应激状态下产生的诱导低氧基因和修复细胞内环境的调节因子^[23]。HIF-1 α 在脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs) 的破坏过程中起重要作用,缺血缺氧后,可见 BMECs 肿胀,空泡形成,部分细胞线粒体肿胀或空泡化,自噬体增多,核糖体脱落,甚至细胞核染色质固缩,最终导致血脑屏障破坏^[24]。

综上所述,我们认为糖尿病性脑内微小病变治疗宜从“虚”“实”两方面入手,扶正祛邪,采用“养阴益气法”。

参考文献:

- [1] 张玉倩,刘笑迎,贾岩辉,等. 糖尿病性脑内微小病变大鼠模型的建立及其病理学研究[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2019,399(2):83-86.
- [2] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA, 2013, 310 (9):948-959.
- [3] YANG Z, XING X, XIAO J, et al. Prevalence of cardiovascular disease and risk factors in the Chinese population with impaired glucose regulation: the 2007-2008 China national diabetes and metabolic disorders study[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2013, 121(6):372-374.
- [4] PINTO A, TUTTOLOMONDO A, DI RAIMONDO D, et al. A case control study between diabetic and non-diabetic subjects with ischemic stroke[J]. Int Angiol, 2007, 26(1): 26-32.
- [5] KNOPMAN D S, GRISWOLD M E, LIRETTE S T, et al. Vascular imaging abnormalities and cognition: mediation by cortical volume in nondemented individuals: atherosclerosis risk in communities-neurocognitive study[J]. Stroke, 2015, 46(2):433-440.
- [6] 曲红, 张玉倩, 周蔓蔓, 等. 脑内微小病变不同干预模式的临床疗效比较[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(3):

- 332-337.
- [7] NISHIYAMA Y, GODA N, KANAI M, et al. HIF-1 α induction suppresses excessive lipid accumulation in alcoholic fatty liver in mice [J]. *Journal of Hepatology*, 2012, 56: 441-447.
- [8] 曲红, 张玉倩, 赵小英, 等. 桂枝茯苓丸加地龙干干预脑内微小病变及预防脑梗死发病的临床研究[J]. *上海中医药杂志*, 2012, 46(8): 15-21.
- [9] 刘笑迎, 曹贺, 钟萍, 等. 益气养阴活血方治疗糖尿病周围神经病变效果观察[J]. *人民军医*, 2015, 58(8): 914-916.
- [10] KNOPMAN D S, GRISWOLD M E, LIRETTE S T, et al. Vascular imaging abnormalities and cognition mediation by cortical volume in non demented individuals: atherosclerosis risk in communities neurocognitive study[J]. *Stroke*, 2015, 46(2): 433-440.
- [11] BOHNSLAOVA R, KOLAR F, SEDMERA D, et al. Partial deficiency of HIF-1 α stimulates pathological cardiac changes in streptozotocin-induced mice [J]. *BMC Endocr Disord*, 2014: 11-14.
- [12] OMEGA A, FEMANDEZ A, ARENAS M I. Outcome of acute renal injury in diabetic mice with experimental endotoxemia: role of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *J Diabetes Res*, 2013: 254-259.
- [13] 李家劫, 徐慧茹, 奚德荣, 等. 新安医家徐春甫《古今医统大全》治疗消渴用药规律及生物信息学分析[J]. *云南中医学院学报*, 2022, 45(5): 70-78.
- [14] WANG V, DAYIS D A, HAQUE M, et al. Differential gene upregulation by hypoxia inducible factor-1 α and hypoxia-inducible factor-2 α in HEK293T cells [J]. *Cancer Res*, 2005: 3299-3306.
- [15] BOHNSLAOVA R, KOLAR F, SEDMERA D, et al. Partial deficiency of HIF-1 α stimulates pathological cardiac changes in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *BMC Endocr Disord*, 2014(14): 11.
- [16] 吴以岭. 络病治疗原则与通络药物[J]. *疑难病杂志*, 2005, 4(4): 213-215.
- [17] 刘笑迎, 张云云, 张捷青. 黄芪、丹参、山药及其复方对高糖所致雪旺细胞凋亡的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2010(1): 41-45.
- [18] 刘宗雳, 刘梦, 潘赐明. 张晓琳教授中西医结合治疗重症糖尿病医案举隅. *云南中医学院学报* [J]. 2022, 45(4): 39-42.
- [19] 曲红, 张玉倩, 赵小英, 等. 桂枝茯苓丸加地龙干干预脑内微小病变及预防脑梗死发病的临床研究[J]. *上海中医药杂志*, 2012(46): 15-21.
- [20] 刘笑迎, 曹贺, 陈姝, 等. 桂枝茯苓丸加地龙对糖尿病性脑内微小病变大鼠治疗效果的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(11): 2634-2637.
- [21] 周小祝, 莫志贤. 桂枝茯苓丸的药理作用研究进展[J]. *医药导报*, 2006, 25(2): 142-143.
- [22] 刘笑迎, 周端, 曹贺. 中药自拟颗粒剂对糖尿病性脑内微小病变治疗效果的临床研究[J]. *人民军医*, 2019, 62(11): 1073-1076.
- [23] NAKAGAWA K, KOHARA T, UEHATA Y, et al. PIAS3 enhances the transcriptional activity of HIF-1 α by increasing its protein stability [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(3): 470-476.
- [24] DANEMAN R. The blood-brain barrier in health and disease [J]. *Ann Neurol*, 2012, 72(5): 648-672.