

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.01.005

PI3K/Akt/GSK-3 β 通路在体外培养神经元缺氧缺血损伤中的作用*

赵婧,李强,何玲

(川北医学院附属医院新生儿科,四川南充 637000)

[摘要] 目的 探讨神经元缺氧缺血损伤时,PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路各分子间的调控机制及干预该信号通路对神经突损伤修复的作用。方法 培养新生 SD 大鼠皮质神经元,建立体外神经元氧糖剥夺(OGD)模型。实验分为 4 组:正常对照组,OGD 组,LY294002 干预组,SB415286 干预组。Western blot 方法检测神经元丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)、磷酸化 Akt(p-Akt)、糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)、p-GSK-3 β 的蛋白表达变化。应用神经元微管蛋白(TUJ1)免疫荧光染色观察神经突受损情况。**结果** 与正常对照组比较,体外培养神经元 OGD 后,p-Akt、p-GSK-3 β 表达降低($P<0.05$)。与 OGD 组比较,LY294002 干预后 p-Akt 和 p-GSK-3 β 表达减少($P<0.05$),神经突损伤明显加重。与 OGD 组比较,SB415286 干预后 p-GSK-3 β 表达增加($P<0.05$),神经突损伤减轻。**结论** PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路调节 OGD 后神经突损伤。

[关键词] 神经元;神经突;Akt;GSK-3 β ;缺氧缺血

[中图分类号] R722.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)01-0018-05

The effect of PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway on the injury of neurons after hypoxia-ischemia in vitro*

ZHAO Jing, LI Qiang, HE Ling

(Department of Neonatology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regulation mechanisms among PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in cultured cortical neurons after hypoxia-ischemia (HI), and explore the neurites injury reparation after intervening this signaling pathway. **Methods** The cerebral cortical neurons from newborn Sprague-Dawley (SD) rats were cultured in vitro and established oxygen-glucose deprivation (OGD) model which imitated HI environment. Cells were divided randomly into 4 groups: the control group, the OGD group, the LY294002 intervention group and the SB415286 intervention group. Western blot was used to detect the protein expression of serine/threonine protein kinase (Akt), phospho-serine/threonine protein kinase (p-Akt), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), phospho glycogen synthase kinase-3 β (p-GSK-3 β) in neurons. Cells were immunostained with anti-neuron specific class III β -tubulin (TUJ1) to observe the injury of neurites. **Results** As compared with the control group, the expression of p-Akt and p-GSK-3 β was significantly decreased after OGD ($P<0.05$). As compared with the OGD group, the expression of p-Akt and p-GSK-3 β was significantly decreased in the LY294002 intervention group ($P<0.05$), and the neurites injury was obviously aggravated. As compared with the OGD group, the p-GSK-3 β expression was significantly increased in the SB415286 intervention group ($P<0.05$), and the immunofluorescence also showed a significant reduction in neurites injury. **Conclusion** PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway is involved in the regulation of neurites injury after OGD.

[Key words] neurons; neurites; Akt; GSK-3 β ; hypoxia-ischemia

新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)是围产期窒息严重并发症之一,病死率及致残率高^[1-2]。目前认为大脑缺氧缺血(hypoxia-ischemia, HI),影响神经突极性结构,破坏神经网络的形成,可能是引起 HIE 神经系统后遗症的重要原因之一^[3]。迄今,已发现神经元极

性分子糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)及磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, PI3K/Akt)在神经突极性建立与维持中发挥重要作用^[4-5]。在 HI 神经元中,PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路是否

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81300528);四川省科技厅基金资助项目(2017JY0115);四川省卫生和计划生育委员会普及应用项目(18PJ041);四川省南充市校合作科研基金资助项目(NSMC20170425)。 作者简介:赵婧(1983-),副主任医师,博士,主要从事新生儿疾病研究。

参与神经元损伤的调节及其信号传递的机制等尚不清楚。因此,本研究在建立新生大鼠皮质神经元氧糖剥夺(oxygen and glucose deprivation, OGD)模型,模拟 HI 基础上,应用 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 和 GSK-3 β 抑制剂 SB415286 进行干预,检测 Akt、p-Akt (Ser-473)、GSK-3 β 、p-GSK-3 β (ser-9) 的表达变化及神经突形态、长度变化,明确 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路在 HI 神经元损伤中的作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂 LY294002、SB415286 购于美国 Cell signaling 公司,兔抗鼠 Akt、p-Akt (ser-473) 抗体、兔抗鼠 GSK-3 β 、p-GSK-3 β (ser-9) 抗体、小鼠微管蛋白 TUJ1 单克隆抗体购于美国 Millipore 公司,小鼠 β -actin 单克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG、HRP 标记羊抗兔 IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司,BCA 蛋白定量试剂盒购于美国 Chemicon 公司,磷酸酶抑制剂、化学发光试剂盒购于美国 Chemicon 公司,Western blot 一抗、二抗去除液购于碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 原代神经元培养 新生 SD 大鼠在 75% 乙醇中浸泡 3~5 min,无菌条件下断头杀死,取出大脑。在解剖镜下分离出大脑皮质并剪碎,以 0.25% 胰蛋白酶和终浓度为 10 μ g/mL 的 DNase I 消化,通过 200 目细胞筛网过滤后,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加含 2% B27 细胞培养添加剂、1% 谷氨酰胺的无血清神经培养基吹打成单细胞悬液,以 2×10^6 /mL 的细胞密度接种于多聚 L 赖氨酸(PLL)包被的 6 孔板盖玻片或 25 cm² 培养瓶中,置 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 孵箱中培养 2 d 后半量换液,培养至第 7 天用于实验。

1.2.2 体外模拟 HI 建立体外 OGD 模型^[6]。将原代培养至第 7 天的神经元弃去培养液,加入无糖 DMEM 培养液模拟细胞缺血状态,再将细胞放入 3 气培养箱中,用含 95% N₂、5% CO₂ 混合气从进气管充气,培养 3 h。3 h 后终止缺氧,并更换为含葡萄糖的神经元培养基,以形成再灌注。取再灌注后 0.5、3、6、12、24、48 h 不同时间点的神经元进行实验。

1.2.3 实验分组 实验分为 4 组:(1)正常对照组:正常培养液孵育的神经元;(2)OGD 组:模型制备后,取再灌注 0.5、3、6、12、24、48 h 观察;(3)LY294002 干预组:应用 LY294002 (20 μ mol/L) 预处理神经元 12 h,再以相同浓度在 OGD 中维持 3 h 后更换为含葡萄糖的神经元培养基;(4)SB415286 干预组:应用 SB415286 (40 μ mol/L) 预处理神经元 12 h,再以相同浓度在 OGD 中维持 3 h 后更换为含葡萄糖的神经元培养基。

1.2.4 Western blot 检测 各组神经元 Akt、p-Akt、

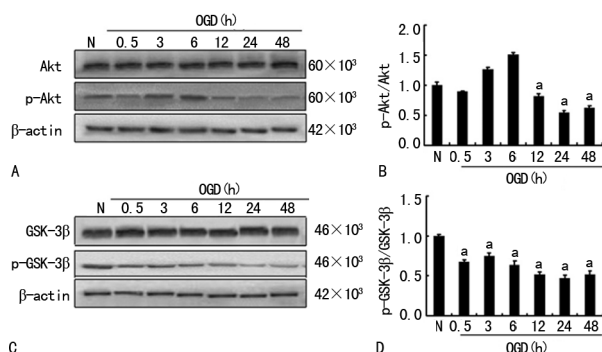
GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白表达 冰上提取神经元蛋白后,BCA 法测定蛋白浓度,-80 $^{\circ}$ C 保存。等量的样品蛋白,经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转膜,相继加入相应的一抗及二抗进行免疫反应,ECL 发光剂显色,置于 Omega 12 ic 凝胶成像仪中显像并拍照,应用 NIH 图像测其吸光度(OD)值,以目的蛋白条带 OD 值/ β -actin 条带 OD 值来表示目的蛋白表达水平。

1.2.5 神经突免疫荧光染色 采用免疫荧光标记 TUJ1。6 孔板培养神经元,4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 20 min,磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗 3 次后滴加免疫荧光封闭液,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,滴加 TUJ1 一抗(1:200),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBS 洗 3 次后滴加异硫氰酸荧光素(FITC)标记二抗(1:200),37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min;滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI),常温孵育 5 min;封片后荧光显微镜下镜检。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差(one-way ANOVA)分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

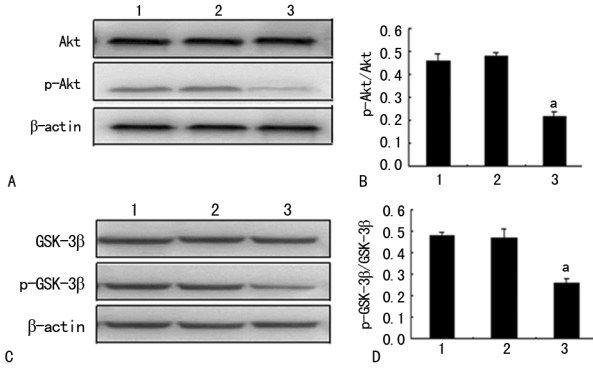
2 结果

2.1 OGD 后 Akt、p-Akt、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白表达 总 Akt ($F = 1.214, P > 0.05$) 及总 GSK-3 β ($F = 0.376, P > 0.05$) 的表达在 OGD 后未发生变化。p-Akt 在 OGD 后 0.5 h 明显降低,在经过短暂升高后(OGD 后 3、6 h),在 12 h 开始下降,24 h 降至最低 ($F = 525.33, P < 0.05$)。p-Akt/Akt 值,在 OGD 后 24 h 降至最低 ($F = 674.46, P < 0.05$),见图 1。p-GSK-3 β 在 OGD 后 0.5 h 开始降低,24 h 降至最低 ($F = 557.243, P < 0.05$)。p-GSK-3 β /GSK-3 β 值在 OGD 后 24 h 降至最低 ($F = 376.581, P < 0.05$),见图 1。



A: 皮质神经元 OGD 后 Akt、p-Akt 表达的 Western blot 图; B: 定量分析 p-Akt/Akt; C: 皮质神经元 OGD 后 GSK-3 β 、p-GSK-3 β 表达的 Western blot 图; D: 定量分析 p-GSK-3 β /GSK-3 β ; N: 正常对照组; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 1 Western blot 检测 OGD 后 Akt、p-Akt、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白的表达

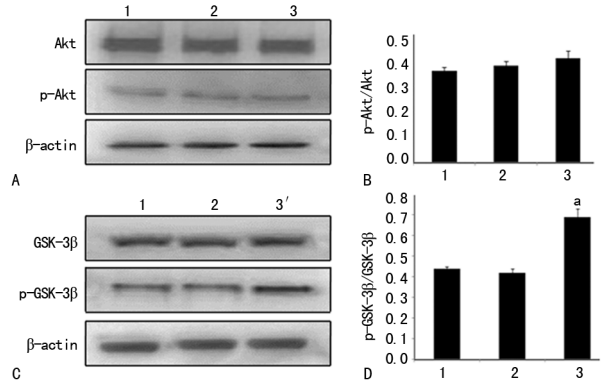


A: Akt 和 p-Akt 蛋白表达的 Western blot 图; B: 定量分析 p-Akt/Akt; C: GSK-3 β 和 p-GSK-3 β 蛋白表达的 Western blot 图; D: 定量分析 p-GSK-3 β /GSK-3 β ; 1: OGD 6 h 组; 2: 正常对照组; 3: LY294002 干预组; *: $P < 0.01$, 与 OGD 组比较

图 2 Western blot 检测应用 LY294002 后 Akt、p-Akt、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白的表达

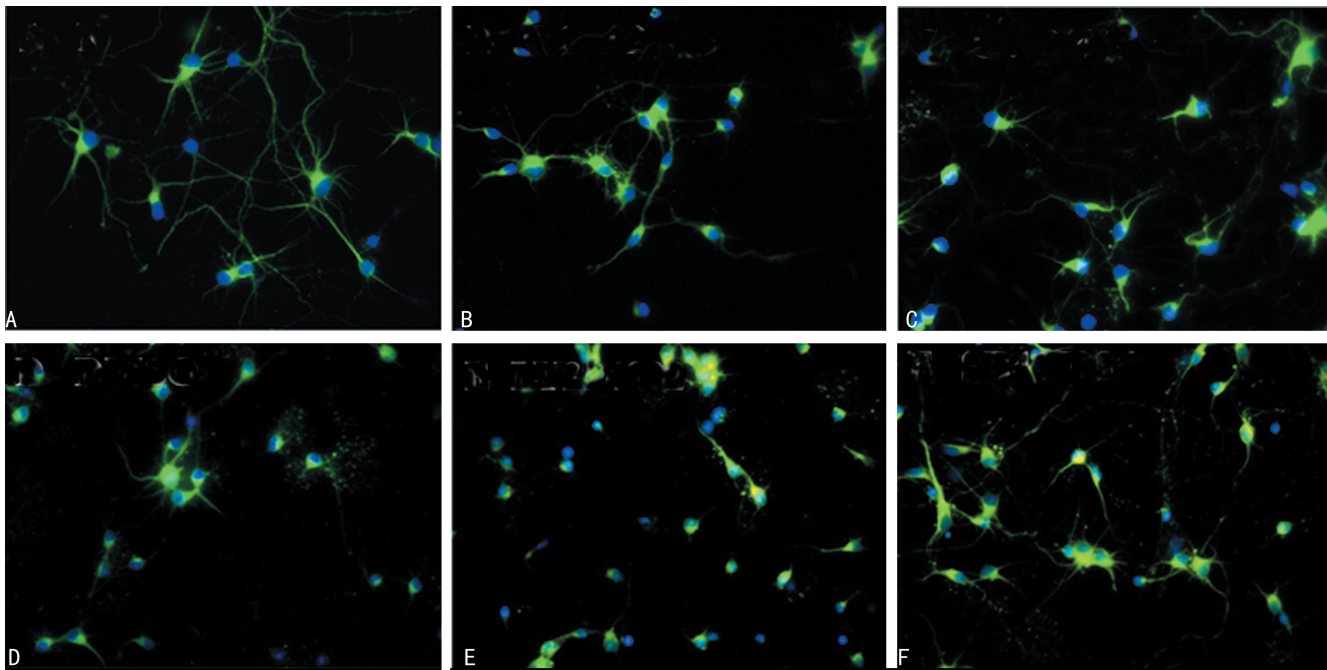
2.2 LY294002 抑制 Akt、GSK-3 β 磷酸化 Western blot 结果显示, LY294002 干预后, 总 Akt 和 GSK-3 β 并未发生变化, 而 p-Akt 和 p-GSK-3 β 表达减少 ($P < 0.05$)。与 OGD 6 h 组比较, p-Akt/Akt 及 p-GSK-3 β /GSK-3 β 在应用 LY294002 后分别降低了约 49% ($F = 242.263, P < 0.01$) 和 42% ($F = 128.114, P < 0.01$), 而 OGD 6 h 组和正常对照组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。

2.3 SB415286 促进 GSK-3 β 磷酸化 Western blot 结果显示, SB415286 干预后, 总 Akt、p-Akt 和总 GSK-3 β 并未发生变化, 而 p-GSK-3 β 表达增加 ($P < 0.05$)。与 OGD 6 h 组比较, p-GSK-3 β /GSK-3 β 在应用 SB415286 后增加了 37% ($F = 122.347, P < 0.01$), 而 OGD 6 h 组和正常对照组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。



A: Akt 和 p-Akt 蛋白表达的 Western blot 图; B: 定量分析 p-Akt/Akt; C: GSK-3 β 和 p-GSK-3 β 蛋白表达的 Western blot 图; D: 定量分析 p-GSK-3 β /GSK-3 β ; 1: OGD 6 h 组; 2: 正常对照组; 3: SB415286 干预组; *: $P < 0.01$, 与 OGD 组比较

图 3 Western blot 检测应用 SB415286 后 Akt、p-Akt、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白的表达



A: 培养第 7 天神经元; B: OGD 后 24 h 组神经元; C: OGD 后 48 h 组神经元; D: 正常对照组神经元; E: LY294002 干预组神经元 (OGD 后 48 h); F: SB415286 处理组神经元 (OGD 后 48 h)

图 4 免疫荧光检测 LY294002 或 SB415286 处理后神经元神经突受损情况 ($\times 400$)

2.4 抑制 PI3K/Akt 活性加重 HI 后神经元神经突损伤 如图 4 所示, 绿色荧光标记的是 TUJ1, 蓝色标

记的是细胞核。培养至第 7 天的神经元形成成熟的极性结构, 即数个树突及 1 个轴突染成绿色荧光, 采

用 NeuroCida 软件测量轴突平均长度为 $(5\ 287 \pm 262)\ \mu\text{m}$ 。OGD 后 24 h, 神经元胞体及神经突近端肿胀, 可见固缩或碎裂的细胞核轴突平均长度为 $(2\ 985 \pm 225)\ \mu\text{m}$ 。48 h 后神经突变细、变直、断裂, 分支减少, 轴突长度为 $(1\ 086 \pm 67)\ \mu\text{m}$ 。以 OGD 后形态变化较明显的时间点 48 h 作为对照, LY294002 干预组在 OGD 后 48 h, 神经元极性结构消失, 仅可见围绕胞体短细的突起, 平均长度为 $(445 \pm 85)\ \mu\text{m}$ 。应用 LY294002 后明显加重神经突损伤, 轴突长度较 OGD 48 h 组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.5 抑制 GSK-3 β 活性减轻缺氧缺血后神经元神经突损伤 SB415286 处理组在 OGD 48 h 后, 神经突近端稍有肿胀, 远端稍变细, 分枝稍减少, 与 OGD 48 h 组 [$(1\ 086 \pm 67)\ \mu\text{m}$] 比较轴突长度明显更长, 平均长度为 $(2\ 692 \pm 207)\ \mu\text{m}$, 见图 4F。应用 SB415286 后可减轻神经突损伤, 轴突长度较 OGD 48 h 组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨 论

神经突是神经元传递和接受神经信号冲动的基 本结构, 也是神经元极性结构形成的基础。在许多神经退行性疾病中都涉及神经突结构和神经元极性的损伤^[7-9]。因此, 探索引起神经突损伤的分子机制及实施相应的干预措施十分重要。本研究发现, 在体外培养神经元 OGD 后 24 h 形态已经发生明显变化, 神经突变短, OGD 后 48 h 神经突分支减少、断裂。这种结构改变可能与 HI 后不可逆的神经元功能损伤有关。

在对神经元极性形成和维持的分子生物学研究 中发现, 高活性的 Akt(My-Akt) 能促进轴突生长^[4]。并且通过上调 PI3K 增强 Akt 磷酸化后可促进外周神经再生^[5]。PI3K/Akt 通过磷酸化调节相关蛋白等途径促进细胞生长、抑制细胞凋亡^[10]。本研究发现, p-Akt 在 OGD 后 0.5 及 12 h 明显降低, 并在后续时间点持续低表达, 提示与相应时间点神经元结构损伤相关。本研究同时发现在 OGD 后 3、6 h p-Akt 有短暂性升高, 这可能与 HI 早期的神经元试图通过上调 Akt 活性减轻损伤有关^[11], 但这种短暂性的 Akt 活性改变并不能逆转神经突结构损伤。

GSK-3 β 是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸类蛋白 激酶^[12]。GSK-3 β 在神经突的磷酸化状态对神经元极性结构形成起决定作用^[13]。神经元共转染高活性的 GSK-3 β (GSK-3 β S9A) 和高活性的 Akt(My-Akt) 后, 可逆转 Myr-Akt 诱导形成的多根轴突^[14]。本研究发 现神经元 OGD 后 p-GSK-3 β 的表达持续降低, 这种变 化可能与神经突损伤相关。同时发现在 OGD 后 12 h

p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 的比值变化趋势基本 一致, 表明两者可能存在一定联系。因此进一步检测 抑制 PI3K/Akt 或 GSK-3 β 活性, 探讨 3 个蛋白间的 调控关系。

LY294002 和 SB415286 分别是 PI3K/Akt 和 GSK-3 β 的特异性抑制剂^[15-16]。抑制 PI3K/Akt 活性 后, 神经元 p-GSK-3 β 表达降低。而抑制 GSK-3 β 后, 神经元 Akt 及 p-Akt 的表达均未发生变化, 表明参与 OGD 后神经元损伤的分子调节中, GSK-3 β 是 PI3K/Akt 的下游信号分子。同时 LY294002 组神经突在 OGD 后 48 h 极性结构消失, 表明抑制 PI3K/Akt 活 性明显加重神经突损伤。而 SB415286 抑制 GSK-3 β 后可部分逆转神经突的损伤, 尽管轴突长度未完全恢 复至正常状态, 但神经元极性结构得以维持。笔者推 测这可能与在体外模型中, 神经元生长的环境单一, 缺乏其他细胞合成的促修复和发育的蛋白分子, 这在 一定程度上影响了损伤的修复。

总之, 体外培养神经元 OGD 后 PI3K/Akt 的活 性发生变化, 通过调控下游蛋白 GSK-3 β 的磷酸化参 与神经突损伤调节机制, 干预 PI3K/Akt/GSK-3 β 信 号通路可能有助于受损神经突的修复。

参考文献

- [1] YILDIZ E P, EKICI B, TATLI B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment[J]. Expert Rev Neurother, 2017, 17(5): 449-459.
- [2] NATARAJAN G, PAPPAS A, SHANKARAN S. Outcomes in childhood following therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) [J]. Semin Perinatol, 2016, 40(8): 549-555.
- [3] WANG X, CHENG J L, RAN Y C, et al. Expression of RGMb in brain tissue of MCAO rats and its relationship with axonal regeneration[J]. J Neurol Sci, 2017, 15(383): 79-86.
- [4] PADMANABHAN S, BURKE R E. Induction of axon growth in the adult brain: a new approach to restoration in Parkinson's disease[J]. Mov Disord, 2018, 33(1): 62-70.
- [5] HUANG H, LIU H, YAN R, et al. PI3K/Akt and ERK/MAPK signaling promote different aspects of neuron survival and axonal regrowth following rat facial nerve axotomy[J]. Neurochem Res, 2017, 42(12): 3515-3524.
- [6] ZHAO J, CHEN Y, XU Y, et al. Effects of PTEN inhibition on the regulation of Tau phosphorylation in rat cortical neuronal injury after oxygen and glucose deprivation [J]. Brain Inj, 2016, 30(9): 1150-1159.

- [7] SAHAB N S, KHOOEI A, SAMINI F, et al. Laminin-derived Ile-Lys-Val-ala-Val; a promising bioactive peptide in neural tissue engineering in traumatic brain injury[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 371(2): 223-236.
- [8] CORREIA S C, PREEY G, MOREIRA P I. Mitochondrial traffic jams in Alzheimer's disease-pinning the roadblocks [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(10): 1909-1917.
- [9] LEE I S, KOO K Y, JUNG K, et al. Neurogenin-2-transduced human neural progenitor cells attenuate neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Transl Res*, 2017, 183: 121-136.
- [10] NAKANO N, MATSUDA S, ICHIMURA M, et al. PI3K/AKT signaling mediated by G protein-coupled receptors is involved in neurodegenerative Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(2): 253-260.
- [11] LI D, LUO L, XU M, et al. AMPK activates FOXO3a and promotes neuronal apoptosis in the developing rat brain during the early phase after hypoxia-ischemia[J]. *Brain Res Bull*, 2017, 132: 1-9.
- [12] KO R, LEE S Y. Glycogen synthase kinase β in Toll-like receptor signaling[J]. *BMB Rep*, 2016, 49(6): 305-310.
- [13] VOHNOUTKA R B, BOUMIL E F, LIU Y, et al. Influence of a GSK3 β phosphorylation site within the proximal C-terminus of Neurofilament-H on neurofilament dynamics [J]. *Biol Open*, 2017, 6(10): 1516-1527.
- [14] BEREZHNYAYA E V, BIBOV M Y, KOMANDIROV M A, et al. Involvement of MAPK, Akt/GSK-3 β and AMPK/mTOR signaling pathways in protection of remote glial cells from axotomy-induced necrosis and apoptosis in the isolated crayfish stretch receptor[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2017, 83: 1-5.
- [15] EBRAHIMI S, HOSSEINI M, SHAHIDSALES S, et al. Targeting the Akt/PI3K signaling pathway as a potential therapeutic strategy for the treatment of pancreatic cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(13): 1321-1331.
- [16] JIANG X, PEREZ-TORRES C J, THOTALA D, et al. A GSK-3 β inhibitor protects against radiation necrosis in mouse brain [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014, 89(4): 714-721.

(收稿日期: 2018-05-26 修回日期: 2018-08-22)

(上接第 17 页)

- [3] 李进华, 邓敏华, 陈平, 等. 慢性阻塞性肺疾病动物模型的研究进展[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(8): 606-609.
- [4] 杨智, 付兵, 李春平, 等. 3.0T MRI 评价早期 COPD 引起的右心改变的实验研究[J]. *放射学实践*, 2016, 31(2): 145-150.
- [5] 杨智. 3.0T MRI 评价由 COPD 引起的右心改变的实验研究[D]. 南充: 川北医学院, 2014.
- [6] GERGES M, GERGES C, NAEIJE R, et al. Pulmonary hypertension due to left heart disease[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2017, 38(5): 662-676.
- [7] 王秋月, 张明娜. 不容忽视的慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(4): 250-252.
- [8] KANWAR M, RAINA A, APONTE M P, et al. Pulmonary hypertension in potential heart transplant recipients: current treatment strategies[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2015, 20(5): 570.
- [9] 李进华, 蔡珊, 彭红. 慢性阻塞性肺疾病动物模型研究现状[J]. *中国医师杂志*, 2015, 17(7): 1118-1120.
- [10] 毛旻, 张钰, 章乐尧. 木瓜蛋白酶诱导猪肺气肿模型的建立[J]. *临床肺科杂志*, 2012, 17(6): 1022-1024.
- [11] MACHADO M N, FIGUEIRÁ' A S F, MAZZOLI-ROCHA F, et al. Papain-induced experimental pulmonary emphysema in male and female mice[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2014, 200(4): 90-96.
- [12] 陈传波, 张宛玉, 马红冰, 等. 犬肺气肿模型的制作[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2005, 40(1): 102-104.
- [13] 段琼, 汪伟民. 不同浓度骨髓间充质干细胞对肺气肿大鼠模型的影响[J]. *中国地方病防治杂志*, 2016(7): 738-739.
- [14] 顾延会, 欧阳瑶. 烟熏联合脂多糖制备大鼠慢性阻塞性肺疾病动物模型[J]. *重庆医学*, 2012, 41(13): 1295-1296.
- [15] LAM C Z, BHAMARE T A, GAZZAZ T A, et al. Diagnosis of secondary pulmonary lymphangiectasia in congenital heart disease: a novel role for chest ultrasound and prognostic implications[J]. *Pediatr Radiol*, 2017, 47(11): 1441-1451.
- [16] GUAZZI M, LABATE V. Pulmonary hypertension in heart failure patients: pathophysiology and prognostic implications[J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2016, 13(6): 281-294.

(收稿日期: 2018-06-18 修回日期: 2018-09-01)