

FTY720 对糖尿病大鼠心肌微血管病变的保护作用

徐洪增, 苗 广, 耿 松, 汪立杰, 金元哲

(中国医科大附属第四医院心内科, 辽宁省沈阳市 110032)

[关键词] FTY720; 糖尿病; 心肌微血管病变

[摘要] **目的** 研究 1-磷酸鞘氨醇受体激动剂芬戈莫德(FTY720)对糖尿病大鼠早期心肌微血管病变的作用。**方法** 将 Sprague-Dawley 大鼠分为正常对照组、糖尿病模型组与 FTY720[0.001 g/(kg·d)]治疗组。大剂量链脲佐菌素(65 mg/kg)腹腔注射制备大鼠糖尿病模型,HE、Masson 染色观察心肌结构大体形态。CD34 免疫组织化学观察心肌微血管密度,TUNEL 免疫荧光检测分析心脏微血管内皮细胞凋亡情况。组织转化生长因子 β (TGF- β)、免疫组织化学观察心肌纤维化程度。Western blot 测定血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素 6(IL-6)表达水平。**结果** 糖尿病模型组以多次随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 作为糖尿病模型成功的标志,本研究中大鼠糖尿病模型构建成功率在 85% 以上。与正常对照组相比,糖尿病模型组大鼠心肌组织微血管壁增厚,VCAM-1、TNF- α 和 IL-6 的表达升高($P < 0.05$);FTY720 治疗组心肌 VCAM-1、TNF- α 与 IL-6 的表达明显低于糖尿病模型组($P < 0.05$)。糖尿病模型组心脏组织微血管密度减少,凋亡指数显著增高;而 FTY720 可以减少凋亡,促进内皮细胞增殖。**结论** FTY720 可能在糖尿病大鼠心脏微血管损伤中具有一定保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective effect of FTY720 on myocardial microvascular lesion in diabetic rat

XU Hong-Zeng, MIAO Guang, GENG Song, WANG Li-Jie, JIN Yuan-Zhe

(Department of Cardiology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110032, China)

[KEY WORDS] FTY720; Diabetes; Myocardial microvascular lesion

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effect of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor agonist FTY720 on early diabetic rat myocardial microvascular lesions. **Methods** Male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into three groups: normal control group, diabetic model group, FTY720-treated group (0.001 g/kg per day orally). Diabetic model rats received intraperitoneal injection of streptozotocin (65 mg/kg). The heart tissue structure was estimated by HE staining. The myocardial microvessel density was observed by CD34 immunohistochemistry. The cardiac microvascular endothelial cell apoptosis was analysed by TUNEL and immunofluorescence mapping. Immunohistochemical staining for TGF- β and type I collagen were observed with respect to collagen content. Western blot analysis was used to investigate VCAM-1, TNF- α , and IL-6 protein expression. **Results** Multiple random blood glucose ≥ 16.7 mmol/L was as a marker of diabetic model. In this study, the success rate of diabetic rat model was above 85%. Compared with the normal control group, diabetic model rat myocardial microvascular wall was thickened, the expression of VCAM-1, TNF- α and IL-6 was higher ($P < 0.05$). The expression of VCAM-1, TNF- α and IL-6 in FTY720-treated group was significantly lower than those in diabetic model group ($P < 0.05$). In diabetic model group, the density of vascular endothelial cells was decreased and the apoptotic index was significantly increased, while FTY720 could reduce the apoptosis and promote the proliferation of endothelial cells. **Conclusion** FTY720 may play a protective role in myocardial microvascular injury in diabetic rats.

冠状动脉微血管功能异常在冠状动脉粥样硬化的发生发展过程中发挥了重要作用^[1-2]。研究糖

[收稿日期] 2017-04-20

[修回日期] 2017-04-25

[基金项目] 辽宁省博士启动基金项目资助(201601119)

[作者简介] 徐洪增,博士,主治医师,研究方向为冠心病的诊断及治疗,E-mail 为 hongzengxu@qq.com。通讯作者金元哲,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,E-mail 为 yzjin@cmu.edu.cn。

尿病微血管病变及其干预药物对冠心病的预防意义显著。1-磷酸鞘氨醇 (sphingosine-1-phosphate, S1P) 受体激动剂芬戈莫德 (FTY720) 作为近年来从冬虫夏草中提纯出来的药物由于能够降低炎症反应, 促进淋巴细胞归巢^[3], 在心血管系统中的作用受到关注。且近年来发现其对糖尿病血管并发症及糖尿病心肌病具有重要的保护作用^[4-5], 能够促进血管生成和缓解血管张力^[6-8], 抑制低密度脂蛋白受体基因敲除小鼠与载脂蛋白 E 基因敲除小鼠的动脉粥样硬化斑块生长^[9-10]。FTY720 通过激活不同的 S1P 受体及下游的信号通路, 对心肌缺血具有保护作用^[11-13], 但是否会对糖尿病心肌微血管病变具有改善作用还缺少相关的研究。本研究的目的是通过在体构建糖尿病大鼠模型, 研究 FTY720 是否会对糖尿病大鼠心肌微血管病变产生有益作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物模型制作

实验动物选择 6 周龄健康成年 Sprague-Dawley 雄性大鼠, 重量 160~170 g。将实验动物随机分成两组: 正常对照组、糖尿病模型组。糖尿病模型组大鼠禁食 12 h 后按 65 mg/kg 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 快速腹腔注射, 注射后 3 天、5 天、7 天测量空腹 4 h 血糖, 测 3 次。如果血糖一直稳定于 16.7 mmol/L 以上, 则表明糖尿病模型复制成功。在造模成功的糖尿病大鼠中随机选取部分模型在饮水中加入 FTY720 0.001 g/(kg·d) 作为 FTY720 治疗组。各组动物均自由饮水, 室温保持在 20℃~25℃, 相对湿度在 40%~70%, 每日光照维持 12 h 昼夜循环, 每 3 周测量一次血糖。每天观察动物的一般状态和体征, 每 3 周一次称量记录动物体重。

1.2 心脏结构测定

动物饲养至 15 周龄后, 处死前用 Vevo2100 型微小超声心动图仪 (VisualSonics) 对大鼠进行相关的指标检测, 综合分析、评估心血管结构改变与心功能之间的关系。动物超声检测前采用 7% 水合氯醛, 按照 0.5 mL/100 g 的剂量腹腔注射麻醉。大鼠处于仰卧位平躺在操作板上, 三导联心电图分别连接到上肢与下肢。胸部刮毛处理, 分别在心脏长轴位与短轴位用二维超声探头测量。在两个时间段进行超声心动图彩色多普勒检测心脏结构与功能: 射血分数 (ejection fraction, EF)、左心室舒张期末内径 (left ventricular internal diameter at end-dias-

tole, LVIDd)、左心室收缩期末内径 (left ventricular internal diameter at end-systole, LVIDs)、左心室后壁舒张期末厚度 (left ventricular posterior wall at end-diastole, LVPWd)、左心室后壁收缩期末厚度 (left ventricular posterior wall at end-systole, LVPWs)、收缩期末室间隔厚度 (interventricular septum at end-systole, IVSs)、舒张期末室间隔厚度 (interventricular septum at end-diastole, IVSd)、二尖瓣血流 E 峰、A 峰与 E/A 比值, 以及左心室缩短分数 (fractional shortening, FS)。

1.3 Western blot 检测

实验结束后, 取左心室 0.3 cm 厚的心肌组织, 在裂解缓冲液中剪碎, 冰浴下匀浆, 4℃ 离心 (10000 r/min, 10 min), 取上清蛋白提取液, 用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白含量, 蛋白提取液以缓冲液 (Tris-HCl 50 mmol/L, DTT 100 mmol/L, SDS 2%, 溴酚蓝 0.1%, 纯甘油 10%) 稀释后于 100℃ 加热 5 min, 再次离心 (12000 r/min, 10 min), 低温保存。SDS-PAGE 上行凝胶电泳分离蛋白并移至聚偏氟乙烯处理的膜上 (Micron Separations, Inc.), 5% 脱脂奶封闭, 加入抗血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 抗体, 4℃ 孵育过夜, 缓冲液洗膜后加入二抗, 共同室温下孵育, 缓冲液洗膜后标记二抗, 室温孵育 2 h, 显色后于凝胶自动成像分析系统下成像。各条带与细胞骨架蛋白 β -actin 条带的吸光度之比为各蛋白相对含量。

1.4 病理学分析与免疫组织化学染色

大鼠处死后快速取心肌组织, 4% 甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m 厚连续切片, 一部分做常规 HE、Masson 病理形态学分析, 另一部分做 CD34、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 与 I 型胶原蛋白免疫组织化学病理切片。心肌组织的胶原分布通过 Masson 染色与 I 型胶原蛋白免疫组织化学染色来评估。采用 TUNEL 免疫荧光检测技术对心脏微血管内皮细胞凋亡进行检测分析。为了观察心肌组织微血管变化采用内皮细胞抗鼠 CD34 单抗免疫组织化学染色法, 每张切片选取 12 个高倍视野, 显微镜观察 CD34 染色阳性的微血管数量, 微血管以内径 < 20 μ m, 只有内皮细胞而无平滑肌细胞的血管为判定标准, 每个切片的毛细血管数量用于评估微血管密度。血管计数在 200× 视野下进行, 所有图像用 Image Pro Plus 6.0 软件来阅读与评估。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Turkey post-hoc 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病大鼠的一般情况

大鼠于 STZ 注射后第 1 周血糖就普遍高于 16 mmol/L, 且呈时间依赖性增高, 第 3 周后达到高峰, 然后血糖稳定在 20~30 mmol/L 范围内波动, 糖尿病模型组血糖明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 提示建模成功。FTY720 治疗组在治疗 6 周后血糖比模型组降低, 并一直持续到实验结束。实验过程中, 糖尿病模型组与 FTY720 治疗组大鼠各死亡 1 只, 糖尿病模型组 1 只大鼠造模不成功。其余大鼠生长良好, 体重持续增加, 注射 STZ 时大鼠体重无明显差异。第 8 周开始, 与正常对照组比较, 糖尿病模型组大鼠体重明显减轻 ($P < 0.05$), 外观污秽无泽, 生长缓慢, 身体消瘦, 多饮多尿, 每天换料 1 次。治疗第 4 周, FTY720 治疗组和糖尿病模型组体重较正常对照组明显下降 ($P < 0.05$), FTY720 治疗组与糖尿病模型组没有统计学差异 (表 1)。

表 1. 各组大鼠体重与血糖水平

Table 1. Body weight and blood glucose characteristics for each group

项 目	周数	正常对照组 ($n = 12$)	糖尿病模型 组($n = 10$)	FTY720 治疗 组($n = 11$)
体重(g)	6	171.5±14.4	168.1±12.4	172.0±11.5
	9	354.2±31.5	243.3±13.2 ^a	255.5±13.3
	12	485.4±98.2	280.5±15.2 ^a	292.6±16.2
	15	524.2±101.9	293.0±21.8 ^a	301.0±17.5
血糖(mmol/L)	6	6.7±0.7	19.5±1.5 ^a	20.3±1.6
	9	7.1±0.4	22.11±2.2 ^a	17.2±2.3
	12	7.2±0.7	25.1±3.11 ^a	17.2±3.4 ^b
	15	8.2±1.8	27.3±2.7 ^a	15.1±2.4 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与糖尿病模型组比较。

2.2 糖尿病大鼠心肌结构与功能变化

糖尿病模型组 EF、FS 较正常对照组明显降低 ($P < 0.05$), FTY720 治疗组 EF、FS 值较糖尿病模型组升高 ($P < 0.05$), 意味着 FTY720 提高了大鼠心肌的收缩

与舒张功能。FTY720 治疗组大鼠二尖瓣 E 峰、E/A 比值较糖尿病模型组升高 ($P < 0.05$; 表 2)。

表 2. 各组大鼠心肌结构与功能变化

Table 2. Changes of rat myocardial structure and function in each group

参 数	正常对照组 ($n = 12$)	糖尿病模型组 ($n = 10$)	FTY720 治疗组 ($n = 10$)
LVIDd(mm)	7.54±0.84	6.58±0.62	6.92±0.63
LVIDs(mm)	4.67±0.72	3.62±0.58	3.93±0.59
IVSd(mm)	1.67±0.27	1.43±0.27	1.52±0.31
IVSs(mm)	2.83±0.39	2.94±0.47	2.48±0.28
FS(%)	47.90±8.52	38.40±4.89 ^a	44.50 ±6.42 ^b
EF(%)	78.20±9.03	66.20±5.23 ^a	73.20 ±5.92 ^b
E(cm/s)	103.53±19.03	83.53±13.28 ^a	92.47±18.31 ^b
A(cm/s)	43.28±11.91	52.16±12.32 ^a	49.27±11.26
E/A	2.38±0.44	1.60±0.25 ^a	1.88±0.36 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与糖尿病模型组比较。

2.3 心肌组织病理学变化

HE 染色显示, 正常对照组大鼠心肌细胞排列紧凑整齐, 细胞核大小均一, 胞浆染色均匀, 胞外基质较少; 糖尿病模型组大鼠心肌趋于肥大, 心肌细胞直径比正常对照组大, 细胞核不甚规则, 排列趋于紊乱, 胞外基质明显增多; FTY720 治疗组大鼠病理情况介于正常对照组与糖尿病模型组之间 (图 1)。Masson 染色显示, 心肌细胞染色呈红色, 间质胶原呈蓝绿色。正常对照组大鼠心肌组织胶原纤维分布均匀、纤细; 糖尿病模型组大鼠心肌内胶原组织明显增多, 粗大胶原纤维相互连接成网状, 排列紊乱, 分布不均, 紧密围绕于心肌细胞周围及小血管周围, 微血管数目减少, 基底膜增厚, 血管周围可见炎性细胞浸润; FTY720 治疗组大鼠相对糖尿病模型组来说, 病理改变较轻, 胶原纤维排列相对整齐, 分布相对均匀, 胶原纤维含量明显减少 (图 2)。

2.4 心肌微血管密度和心肌细胞凋亡指数的变化

糖尿病模型组大鼠的微血管密度与正常对照组相比明显减少 ($P < 0.05$); FTY720 治疗组大鼠的微血管密度与糖尿病模型组相比明显增加 ($P < 0.05$)。糖尿病模型组心肌细胞凋亡指数明显升高 ($P < 0.01$); FTY720 治疗组心肌微血管增生明显增加, 心肌细胞凋亡指数明显降低 ($P < 0.01$; 图 3)。

2.5 心肌组织 TGF-β 和 I 型胶原蛋白的表达

与正常对照组相比, 糖尿病模型组微血管壁增厚, TGF-β 染色明显增高 (6.12%±0.71% 比 3.42%±0.56%, $P < 0.05$)。FTY720 治疗组 TGF-β 染色较糖尿

病模型组明显降低($4.65\% \pm 0.31\%$ 比 $6.12\% \pm 0.71\%$, $P < 0.05$),但仍高于正常对照组($P < 0.05$)。糖尿病模型组纤维化程度比正常对照组明显增高($10.50\% \pm 0.82\%$ 比 $5.85\% \pm 0.69\%$, $P < 0.05$),FTY720 治疗组心肌纤维化程度较糖尿病模型组明显降低($6.73\% \pm 0.80\%$ 比 $10.50\% \pm 0.82\%$, $P < 0.05$;图 4)。

2.6 心肌组织 IL-6、VCAM-1 和 TNF-α 的表达

Western blot 结果显示,糖尿病模型组大鼠心肌组织 IL-6、VCAM-1 和 TNF-α 的表达较正常对照组明显增高($P < 0.05$),FTY720 治疗组 IL-6、VCAM-1 和 TNF-α 的表达较糖尿病模型组明显降低($P < 0.05$;图 5)。

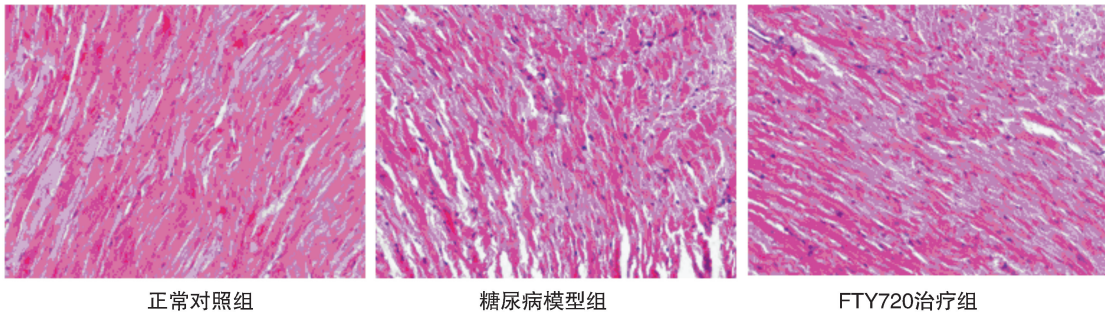


图 1. 各组大鼠心肌组织 HE 染色 (200×)
Figure 1. HE staining of rat myocardial tissue in each group(200×)

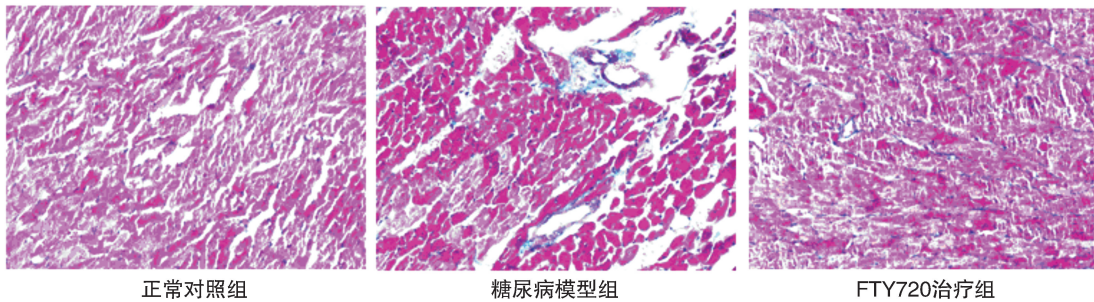


图 2. 各组大鼠心肌组织 Masson 染色 (200×)
Figure 2. Masson staining of rat myocardial tissue in each group(200×)

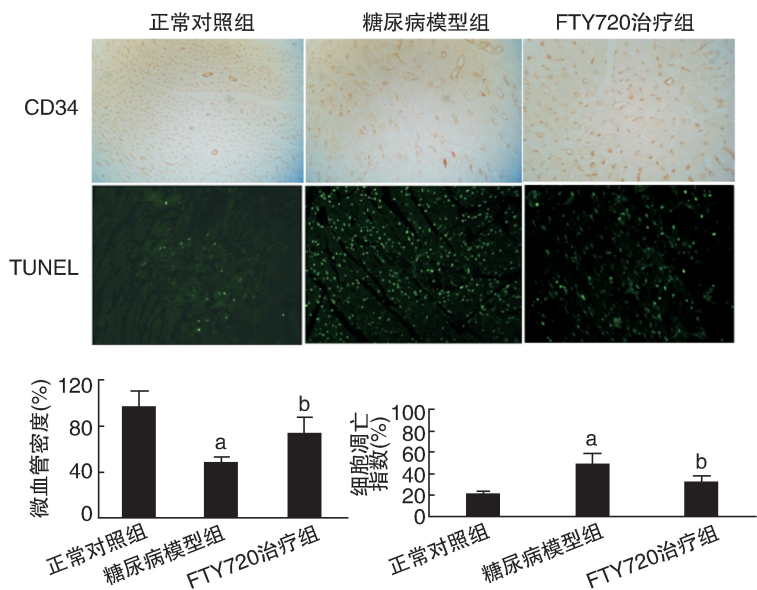


图 3. 各组大鼠心肌 CD34 免疫组织化学染色与 TUNEL 凋亡染色($n = 10$, 200×) a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与糖尿病模型组比较。

Figure 3. Immunohistochemical staining of rat myocardial CD34 and apoptosis of TUNEL in each group($n = 10$, 200×)

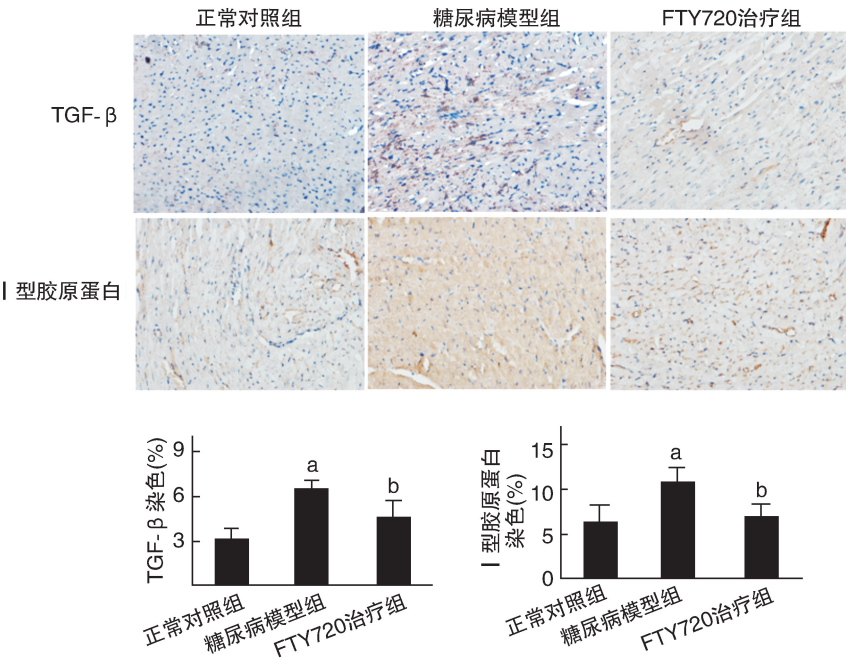


图 4. 各组大鼠心肌组织 TGF-β、I 型胶原蛋白免疫组织化学染色 (n = 10, 200×) a 为 P<0.05, 与正常对照组比较; b 为 P<0.05, 与糖尿病模型组比较。

Figure 4. Immunohistochemical staining of rat myocardial TGF-β and type I collagen in each group (n = 10, 200×)

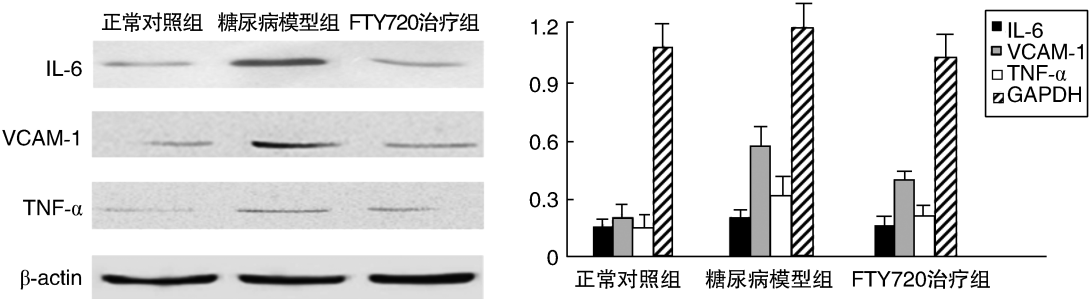


图 5. 各组大鼠心肌组织 IL-6、VCAM-1 和 TNF-α 的蛋白表达 a 为 P<0.05, 与正常对照组比较; b 为 P<0.05, 与糖尿病模型组比较。

Figure 5. Protein expression of rat myocardial IL-6, VCAM-1 and TNF-α in each group

3 讨 论

糖尿病被认为是冠心病的等危症^[14-15]。糖尿病对血管的作用首先表现为内皮功能不全与毛细血管疏松,这个初期的影响会导致微血管病变及微循环异常,局部会出现低灌注^[16]。冠状动脉微循环功能的降低可以增加心血管疾病的死亡率,所以研究改善冠状动脉微血管病变的药物具有非常重要的临床意义。本研究成功构建了糖尿病大鼠微血管病变模型,并发现连续口服 FTY720 10 周后改善了大鼠糖尿病心肌微血管的结构。有关 FTY720 对血管炎症因子表达的影响是有争议的。本研究发

现,经过 FTY720 干预后大鼠心肌组织炎症因子 IL-6、VCAM-1 和 TNF-α 的表达减少,这可能是 FTY720 起到保护作用的机制之一。有研究证明 FTY720 可以促进血管增生,NO 释放,降低血管黏附分子表达,可能会进一步降低血管通透性,改善血管阻力,促进微血管舒张能力,从而改善微循环。这些作用都说明 FTY720 对糖尿病微血管病变是有益的。有趣的是,在本研究中,FTY720 治疗组大鼠血糖明显降低,直接改善了糖尿病症状,既往研究也有类似的报道,其机制可能是降低胰腺炎症反应,抑制 Th1 细胞进入胰腺,保护胰岛细胞部分功能^[17-18]。

S1P 受体激动剂药物作用复杂,可能同时激活

多条信号通路,有少量报道称糖尿病大鼠体内 S1P 水平存在升高的现象,以及 S1P 有致炎作用,这一结论与大部分结果是矛盾的。既往关于 S1P 受体激动剂对微循环的研究较少,有研究表明 S1P 通过 PI3K/AKT 旁路刺激 NO 释放诱导血管舒张效应,可以增加微血管局部血流^[19],也有研究表明在急性肾损伤模型中,FTY720 降低了肾脏的局部血流,但是大部分研究认为 S1P 受体激动剂能够降低血管紧张度。FTY720 是一种被证明副作用很低的药物。有报道称 FTY720 可引起心动过缓、恶心、呕吐等副反应,本研究未对 FTY720 对糖尿病大鼠的副作用进行详细的评估,这也是本研究的缺陷之一,所以如何进一步开发心血管选择性 S1P 受体激动剂,减少副反应等还需要进一步研究。

综上所述,FTY720 在糖尿病大鼠的心脏微血管损伤中具有保护作用,表现在改善心脏冠状动脉微循环,减轻细胞凋亡的作用上。其可能是通过以下机制引起的:促进血管增生、抑制心肌纤维化程度、降低 IL-6、VCAM-1 及 TNF- α 等血管炎性因子表达。因此在糖尿病患者的饮食策略上纳入富含 S1P 受体激动剂的药物如 FTY720 是否会延缓血管病变是令人感兴趣的话题。同时,对于冠心病伴糖尿病患者内、外科手术中不可避免的心肌缺血再灌注损伤问题,是否能够通过饮食策略适当干预而改善糖尿病患者术后的心脏功能康复,是临床上更感兴趣和关心的问题,但这些设想仍需要对糖尿病血管病变的作用机制进行进一步研究,需要更有力的基础理论依据来实现。

[参考文献]

- [1] Rosenson RS, Fioretto P, Dodson PM. Does microvascular disease predict macrovascular events in type 2 diabetes[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 218: 13-18.
- [2] Del Cañizo Gómez FJ, Fernández Pérez C, Moreno Ruiz I, et al. Microvascular complications and risk factors in patients with type 2 diabetes[J]. *Endocrinol Nutr*, 2011, 58: 163-168.
- [3] Park SJ, Im DS. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators and drug discovery[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2017, 25(1): 80-90.
- [4] Rana A, Sharma S. Mechanism of sphingosine-1-phosphate induced cardioprotection against I/R injury in diabetic rat heart: Possible involvement of glycogen synthase kinase 3 β and mitochondrial permeability transition pore[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, 43(2): 166-173.
- [5] Yin Z, Fan L, Wei L, et al. FTY720 protects cardiac microvessels of diabetes: a critical role of S1P1/3 in diabetic heart disease [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e42900.
- [6] van Vuuren D, Marais E, Genade S, et al. The differential effects of FTY720 on functional recovery and infarct size following myocardial ischaemia/reperfusion [J]. *Cardiovasc J Afr*, 2016, 27(6): 375-386.
- [7] Guerrero M, Urbano M, Roberts E. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 agonists: a patent review (2013-2015)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(4): 455-470.
- [8] Sanchez T. Sphingosine-1-phosphate signaling in endothelial disorders[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2016, 18: 31.
- [9] Nofer JR, Bot M, Brodde M, et al. FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. *Circulation*, 2007, 115: 501-508.
- [10] 张大棣, 张智超, 伍荣, 等. 1-磷酸鞘氨醇受体在心血管系统中的作用及机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(11): 1047-052.
- [11] Goltz D, Huss S, Ramadori E, et al. Immunomodulation by splenectomy or by FTY720 protects the heart against ischemia reperfusion injury[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(11): 1168-177.
- [12] Luk FS, Kim RY, Li K, et al. Immunosuppression with FTY720 reverses cardiac dysfunction in hypomorphic ApoE mice deficient in SR-BI expression that survive myocardial infarction caused by coronary atherosclerosis[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2016, 67(1): 47-56.
- [13] Wang G, Kim RY, Imhof I, et al. The immunosuppressant FTY720 prolongs survival in a mouse model of diet-induced coronary atherosclerosis and myocardial infarction[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 63(2): 132-143.
- [14] Hermans MP, Brotons C, Elisaf M, et al. Optimal type 2 diabetes mellitus management: the randomised controlled OPTIMISE benchmarking study: baseline results from six European countries[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2013, 20: 1095-105.
- [15] Bulughapitiya U, Siyambalapitiya S, Sithole J, et al. Is diabetes a coronary risk equivalent? Systematic review and meta-analysis[J]. *Diabet Med*, 2009, 26(2): 142-148.
- [16] Yuksel Kalkan G, Gur M, Elbasan Z, et al. Left ventricle geometry affects coronary flow reserve in diabetic patients[J]. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 2015, 43(1): 49-57.
- [17] Jorns A, Rath KJ, Terbish T, et al. Diabetes prevention by immunomodulatory FTY720 treatment in the LEW.1AR1-iddm rat despite immune cell activation[J]. *Endocrinology*, 2010, 151: 3555-565.
- [18] Srinivasan S, Bolick DT, Lukashev D, et al. Sphingosine-1-phosphate reduces CD4⁺ T-cell activation in type 1 diabetes through regulation of hypoxia-inducible factor short isoform I.1 and CD69[J]. *Diabetes*, 2008, 57: 484-493.
- [19] Takuwa Y, Du W, Qi X, et al. Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis[J]. *World J Biol Chem*, 2010, 1(10): 298-306.

(此文编辑 文玉珊)