

## 黄秋葵醇提取物中2种成分对肝细胞糖异生及 AMPK $\alpha$ 磷酸化的影响

谢秀英, 陈琳\*, 雷涛, 陆明, 申甜, 徐碧林  
(上海中医药大学附属普陀医院内分泌科, 上海 200062)

**摘要:** 目的 观察黄秋葵醇提取物中槲皮素和异槲皮苷对肝细胞糖异生及磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6Pase) 的影响, 并探讨其机制。方法 体外培养小鼠原代肝细胞, 以乳酸和丙酮酸为糖异生底物。予不同浓度槲皮素、异槲皮苷干预 24 h 后, 葡萄糖氧化酶法测定培养液上清葡萄糖浓度, RT-PCR 法检测 PEPCK、G6Pase、AMPK $\alpha$  mRNA 表达, Western blot 法检测总 AMPK $\alpha$ 、AMPK $\alpha$  Thr172 磷酸化水平。结果 与空白组比较, 糖异生诱导组上清葡萄糖浓度显著升高 ( $P < 0.01$ ); 槲皮素和异槲皮苷干预后, 80  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素组、异槲皮苷组显著低于糖异生诱导组 ( $P < 0.01$ ); 糖异生诱导组 PEPCK、G6Pase AMPK $\alpha$  mRNA 相对表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 80  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素组、异槲皮苷组 PEPCK、G6Pase 表达显著低于糖异生诱导组 ( $P < 0.05$ )。Western blot 显示, 80  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素组、异槲皮苷组 AMPK $\alpha$  Thr172 磷酸化水平均较糖异生诱导组增加。结论 黄秋葵醇提取物中槲皮素和异槲皮苷呈剂量依赖性地抑制体外培养原代肝细胞糖异生及其关键酶基因转录, AMPK $\alpha$  Thr172 磷酸化可能与两者抑制糖异生机制有关。

**关键词:** 黄秋葵醇提取物; 槲皮素; 异槲皮苷; 肝细胞糖异生; AMPK $\alpha$ ; 磷酸化

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)05-1167-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.034

2013 年糖尿病流行病学调查分析显示, 有近 12% 的中国成年人患有糖尿病, 其前期患病率达 50%<sup>[1]</sup>。糖异生是糖尿病发病的重要环节, 在肝脏胰岛素抵抗时, 肝细胞对胰岛素调节糖代谢作用敏感性降低, 升糖激素异常升高, 导致肝糖输出增多, 是糖尿病及早期糖代谢紊乱的重要机制, 故有效抑制肝脏过度糖异生、减少内源性葡萄糖生成是降糖治疗的重要手段。黄秋葵 *Abelmoschus esculentus* (Linn.) Moench 又名补肾草、秋葵、羊角豆等, 为锦葵科秋葵属一年生草本植物, 可通过多种调节糖代谢机制改善糖尿病患者血糖、防治早期糖代谢紊乱<sup>[2-4]</sup>, 但目前其降糖机制, 尤其是对肝脏葡萄糖代谢和糖异生的影响尚未明确。因此, 本实验观察黄秋葵醇提取物槲皮素和异槲皮苷对肝细胞葡萄糖产生的影响, 并探讨其机制。

### 1 材料

雄性 C57/BL 小鼠, 体质量 18~20 g, 购自上海斯莱克动物实验中心, 实验动物合格证号 SCXK (沪) 2012-0002。无糖 DMEM 培养基、胎牛血清、IV 型胶原酶、无钙 hanks 购自美国 Gibco 公司; PBS 缓冲液、青链霉素混合液 (100 $\times$ ) 购自美国 Hyclone 公司。槲皮素、异槲皮苷、丙酮酸、乳酸、环磷酸腺苷 (cAMP)、二甲双胍购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶购自碧云天生物科技公司; PhosSTOP 磷酸酶抑制剂购自瑞

士罗氏公司; Trizol、TBST 溶液购自北京博凌科为生物技术有限公司; PVDF 膜购自美国 Amersham 公司; 葡萄糖含有量测试盒购自深圳子科生物技术有限公司; RT-PCR 及逆转录试剂盒购自日本 Takara 公司; 总 AMPK $\alpha$  抗体、AMPK $\alpha$  Thr172 磷酸化抗体 (pT172-AMPK)、内参抗体  $\beta$ -actin 购自英国 Abcam 公司。PEPCK、AMPK $\alpha$  引物设计合成由上海生物工程股份有限公司完成。

### 2 方法

2.1 小鼠肝脏原代细胞分离 小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥麻醉后, 肌肉注射 0.01~0.02 mL 肝素钠抗凝, 75% 乙醇消毒皮肤, 将静脉留置针插入肝门静脉并用丝线同定, 在体灌注 4 $^{\circ}\text{C}$  预冷的无钙 Hanks 缓冲液后分离肝脏, 缓慢离体循环灌注 37 $^{\circ}\text{C}$  预热含钙 Hanks 配置的 0.05% IV 型胶原酶, 分离肝细胞制成悬液, 100  $\mu\text{m}$  筛网过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 清洗细胞, 再次低温离心, 取细胞重悬液, 移入肝细胞培养液, 以  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  /mL 密度铺 6 孔板, 24 h 后细胞贴壁。换成含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液的无糖 DMEM 培养基。

2.2 肝细胞糖异生诱导和检测 小鼠原代肝细胞贴壁 24 h 后, 无糖 DMEM 培养 24 h, 以 10 mmol/L 乳酸 + 1 mmol/L 丙酮酸混合液为糖异生底物, 同时加入 100 nmol/L 地塞米松 + 100  $\mu\text{mol/L}$  cAMP 的混合溶液作为糖异生诱导剂。根

收稿日期: 2018-01-24

基金项目: 上海市普陀区科委科研项目 (15-PT-05)

作者简介: 谢秀英 (1994—), 女, 硕士生, 研究方向为糖代谢紊乱早期防治。E-mail: 813132913@qq.com

\* 通信作者: 陈琳 (1978—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为糖代谢紊乱早期防治。Tel: (021) 22233222, E-mail: 18602108180@163.com

据培养基中是否同时加入槲皮素、异槲皮苷及二甲双胍, 分组为空白对照组、糖异生诱导组、40 μmol/L 槲皮素组、80 μmol/L 槲皮素组、40 μmol/L 异槲皮苷组、80 μmol/L 异槲皮苷组、500 μmol/L 二甲双胍组, 培养 24 h 后, 取 200 μL 培养液上清, 4 °C、2 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 按葡萄糖含有量试剂盒要求加入反应液, 37 °C 水浴 20 min, 在 550 nm 波长处检测吸光度 A, 计算细胞葡萄糖生成。

2.3 糖异生基因 mRNA 表达检测 小鼠肝原代细胞铺于 6 孔板, 按上述条件诱导糖异生和分组处理, 培养 24 h 后弃去上清, PBS 清洗 2 遍, Trizol 法抽提总 RNA, 测定总 RNA 水平, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 在 1.8~2.0 之间可视为 RNA 提取纯度高, 逆转录反应按照试剂说明书进行。以 GADPH 为内参校正。引物序列为磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK), 正向 5' -AGCATTCAACGCCAGGTTTC-3', 反向 5' -CGAGTCTGTCAGTTCAATACCAA-3'; 葡萄糖 6 磷酸脱氢酶 (G6Pase), 正向 5' -TACAGCAACACTTCGGTGCC-3', 反向 5' -CGTAGTATACACCTGCTGTGCC-3'; AMPKα, 正向 5' -TCTGAGGGGCACCAAGAAAC-3', 反向 5' -GTGGGTGTTGACGGAGAAGAG-3'; 以 GADPH 为内参, 引物正向 5' -AGGTCGGTGTGAACGGATTTC-3'。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 7 min, 扩增完毕后, 读取 Ct (扩增循环) 值, 根据目的基因和内参 Ct 值计算 2<sup>-ΔΔCt</sup>, 表示目的基因 mRNA 相对表达量。

2.4 AMPK 蛋白及磷酸化水平检测 小鼠肝原代细胞铺于 6 孔板, 按上述条件诱导糖异生和分组处理, 培养 24 h 后

弃去上清, 冰冷 PBS 清洗 2 遍, 每孔加入 200 μL RIPA 裂解液、100 μg PMSF 蛋白酶抑制剂、PhosSTOP 磷酸酶抑制剂, 静置冰上 5 min 后刮下细胞, 移入 1.5 mL 离心管, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用考马斯亮蓝 G250 蛋白定量测定法测定其蛋白水平, 于 -70 °C 下保存。灌制 6% 浓缩胶和 12% 分离胶, 经湿转到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液在 37 °C 下孵育 30 min, 加入小鼠抗 T-AMPK、Thr172p-AMPKα 抗体和小鼠抗 β-actin 抗体孵育 (1:6 000), 4 °C 过夜。最后, 加入碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG 和马抗小鼠 IgG (1:2 000), 37 °C 下孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, β-萘酚磷酸显色, 分析图像。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 对肝细胞葡萄糖生成和 PEPCK 的影响 培养 24 h 后, 糖异生诱导组较空白组上清葡萄糖浓度显著升高 (P < 0.01); 槲皮素和异槲皮苷干预后, 80 μmol/L 槲皮素组、异槲皮苷组、二甲双胍组显著低于糖异生诱导组 (P < 0.01)。同时, 糖异生诱导组 PEPCK、G6Pase 表达较空白组显著升高 (P < 0.01), 80 μmol/L 槲皮素组、异槲皮苷组 PEPCK、G6Pase 表达较糖异生诱导组明显下降 (P < 0.05), 二甲双胍组 PEPCK、G6Pase 表达较糖异生诱导组明显下调 (P < 0.01)。各组 AMPKα mRNA 表达无显著性差异 (P > 0.05)。见表 1。

表 1 各组肝细胞葡萄糖生成和 PEPCK、G6Pase 表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	葡萄糖生成 / (μmol·L <sup>-1</sup> )	PEPCK (/GADPH)	G6Pase (/GADPH)	AMPKα (/GADPH)
糖异生诱导组	179.50 ± 31.85	31.53 ± 2.13	28.41 ± 1.68	22.20 ± 0.86
空白组	55.17 ± 8.03	15.66 ± 3.91	17.44 ± 3.40	23.25 ± 0.40
二甲双胍组	111.50 ± 25.42 <sup>b</sup>	21.00 ± 2.30 <sup>b</sup>	23.05 ± 3.40 <sup>b</sup>	23.58 ± 0.68 <sup>b</sup>
40 μmol/L 槲皮素组	177.33 ± 20.07	30.27 ± 2.17	28.09 ± 2.79	23.06 ± 0.59
80 μmol/L 槲皮素组	139.50 ± 21.29 <sup>b</sup>	28.21 ± 3.21 <sup>b</sup>	26.58 ± 3.31 <sup>a</sup>	22.52 ± 0.99
40 μmol/L 异槲皮苷组	170.75 ± 27.29	29.34 ± 1.37	27.87 ± 2.24	22.85 ± 0.65
80 μmol/L 异槲皮苷	124.62 ± 24.33 <sup>b</sup>	27.07 ± 2.13 <sup>b</sup>	24.94 ± 2.23 <sup>a</sup>	22.83 ± 0.75

注:与糖异生诱导组比较, <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01; 与空白组比较, <sup>d</sup>P < 0.01

3.2 对肝细胞 AMPKα、AMPKα Thr172 磷酸化水平的影响 80 μmol/L 槲皮素组、异槲皮苷、二甲双胍组 AMPKα Thr172 磷酸化水平均较糖异生诱导组明显增加; 糖异生诱导组 AMPKα 蛋白、pT172-AMPK 表达均明显减少, 其余各组间无显著差异。见图 1。

### 4 讨论

糖尿病是由胰岛素分泌和 (或) 作用障碍引起的糖、蛋白质、脂肪、水、电解质等代谢紊乱, 长期慢性血糖可导致心、脑、肾、视网膜、神经等慢性并发症。肝糖异生增多是 2 型糖尿病发生的重要机制, 其中糖异生是指非糖前体 (乳酸、丙酮酸、氨基酸和甘油) 转变为葡萄糖的过程, 主要在肝脏内进行。减少异常活跃的肝糖异生, 是糖

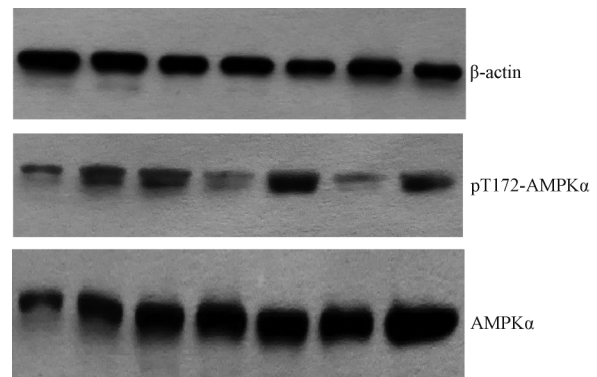


图 1 各组肝细胞 AMPKα、pT172-AMPKα 水平比较

尿病防治的重要靶标。由于糖尿病各种慢性并发症的发病率、致残致死率逐年上升,而且发病机制复杂,当前大部分降糖药物防治其并发症及降低死亡率的效果不理想,部分口服降糖药甚至增加心力衰竭住院及心脑血管疾病风险。近年来,具有降糖效应的药用植物备受关注,越来越多的人致力于从中寻找安全有效的成分来治疗和控制糖尿病及其并发症。

传统医学认为,糖尿病(消渴)的病机为阴虚燥热,多见于肺、胃、肾,临床表现为多尿、多饮、多食、体质减轻、迁延日久、气阴两伤、阴损及阳、脉络瘀阻,最终发展为各种并发症。具有降糖功效的天然植物多属寒凉之品,具有益气养阴、生津润燥之效,或兼有活血化痰之功,如苦瓜、黄连、天花粉、百合、秋葵、桑叶等。现代药理研究发现,桑叶<sup>[5]</sup>能降低胰岛素抵抗;枸杞<sup>[6]</sup>可提高新陈代谢,控制体重;苦瓜<sup>[7]</sup>可促进胰岛素分泌,增强组织对糖的摄取,抑制肠内葡萄糖吸收和肝糖异生;秋葵<sup>[8]</sup>有强抗氧化能力,均具有降糖功效。其中,黄秋葵主要活性成分为黄酮<sup>[9]</sup>,包括芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、棉皮素-8-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、杨梅素、槲皮素-3'-O-葡萄糖苷、槲皮素<sup>[10]</sup>。

已有研究证实,秋葵醇提取物中槲皮素和异槲皮苷可降低早期糖代谢紊乱患者血糖<sup>[11]</sup>,其机制包括拮抗氧化应激和胰岛素抵抗<sup>[12]</sup>、抑制肠道α-葡萄糖苷酶<sup>[13]</sup>、升高内源性胰高血糖素样肽-1(GLP-1)水平<sup>[14]</sup>等,表明两者具有调节糖代谢、改善胰岛素分泌的作用。Zhou等<sup>[15]</sup>研究发现,异槲皮苷可增强AMPK的磷酸化;Ahn等<sup>[16]</sup>发现,槲皮素可上调磷酸化的AMPK及其底物乙酰辅酶A羧化酶(ACC)的水平; Babujanathanam等<sup>[17]</sup>报道,槲皮素可恢复肝糖原含量和抑制糖异生关键酶(葡萄糖-6-磷酸酶和果糖1,6-二磷酸酶)的活性。然而,目前鲜有关于两者抑制肝糖异生作用机制的研究。

肝脏是糖异生的主要器官,肝糖异生过程需要4个与糖酵解过程不共用的关键酶催化,即PEPCK、G6Pase、丙酮酸羧化酶(PC)、二磷酸果糖酶磷酸酶(FbPase),以上关键酶的调节是通过AMPK影响下游多种细胞因子实现的。AMPK被称为“能量感受器”,通过α-亚基苏氨酸残基(Thr172)磷酸化激活<sup>[18]</sup>,阻止糖异生重要调节因子CREB辅激活物2(TORC2)进入细胞核发挥作用,抑制多种激活PEPCK与G6Pase的细胞因子,如过氧化物酶体增殖物γ协同刺激因子α(PGC-1α)、叉头转录因子O1(FOXO1)、肝细胞核因子4α(HNF4α)等,从而减少肝糖异生,降低血糖水平<sup>[19]</sup>。

前期研究发现,黄秋葵提取物可能通过促进AMPK转录、抑制PEPCK基因转录<sup>[20]</sup>来改善胰岛素抵抗小鼠外周胰岛素敏感性和糖异生,但其具体活性成分及机制尚需进一步阐明。本实验发现,80 μmol/L异槲皮苷组葡萄糖产生较糖异生诱导组显著下降,提示肝糖异生减少,有降血糖作用;80 μmol/L槲皮素、异槲皮苷组AMPK αThr172磷

酸化水平均较糖异生诱导组增加,但PEPCK、G6Pase表达显著降低,提示两者可抑制体外培养原代肝细胞糖异生和PEPCK的基因转录,并呈剂量依赖性,其机制可能与AMPKαThr172磷酸化有关。

然而,本研究仅为体外实验,还需进行体内实验以进一步验证槲皮素和异槲皮苷对机体糖异生的影响。同时,本实验还发现两者可促进肝细胞AMPK磷酸化调节,但其是否会影响AMPK上游因子(肝脏激酶B1, LKB1)及下游信号因子(如FoxO1、CREB、TORC2、HNF4α、PGC-1α)来调节肝糖异生尚有待深入考察。

#### 参考文献:

- [1] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. *JAMA*, 2013, 310(9): 948-958.
- [2] Khatun H, Rahman A, Biswas M, et al. Water-soluble fraction of *Abelmoschus esculentus* L interacts with glucose and metformin hydrochloride and alters their absorption kinetics after coadministration in rats[J]. *ISRN Pharm*, 2011: 260537.
- [3] Sabitha V, Ramachandran S, Naveen R, et al. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of *abelmoschus esculentus* in streptozotocin induced diabetic rats[J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2011, 3(3): 397-402.
- [4] Fan S, Guo L, Zhang Y, et al. Okra polysaccharide improves metabolic disorders in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(11): 2075-2078.
- [5] Tanabe K, Nakamura S, Omagari K, et al. Repeated ingestion of the leaf extract from *Morus alba* reduces insulin resistance in KK-Ay mice[J]. *Nutr Res*, 2011, 31(11): 848-854.
- [6] Amagase H, Nance D M. *Lycium barbarum* increases caloric expenditure and decreases waist circumference in healthy overweight men and women: pilot study[J]. *J Am Coll Nutr*, 2011, 30(5): 304-309.
- [7] Prabhakar P K, Doble M. Mechanism of action of natural products used in the treatment of diabetes mellitus[J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(8): 563-574.
- [8] Mishra N, Kumar D, Rizvi S I. Protective effect of *Abelmoschus esculentus* against alloxan-induced diabetes in wistar strain rats[J]. *J Diet Suppl*, 2016, 13(6): 634-646.
- [9] Xia F, Zhong Y, Li M, et al. Antioxidant and anti-fatigue constituents of okra[J]. *Nutrients*, 2015, 7(10): 8846-8858.
- [10] 陆林玲, 钱大玮, 郭建明, 等. 一测多评法测定黄蜀葵花中7个黄酮类成分[J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(12): 2082-2087.
- [11] Khosrozadeh M, Heydari N, Abootalebi M. The effect of *Abelmoschus esculentus* on blood levels of glucose in diabetes mellitus[J]. *Iran J Med Sci*, 2016, 41(3): S63.
- [12] Tian Z H, Miao F T, Zhang X, et al. Therapeutic effect of okra extract on gestational diabetes mellitus rats induced by streptozotocin[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, 8(12): 1038-1042.
- [13] Thanakosai W, Phuwapraisrisan P. First identification of α-glucosidase inhibitors from okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds

- [J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8(8): 1085-1088.
- [14] Phuwamongkolwivat P, Hira T, Hara H. A nondigestible saccharide, fructooligosaccharide, increases the promotive of a flavonoid,  $\alpha$ -glucosyl-isoquercitrin, on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) secretion in rat intestine and enteroendocrine cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(7): 1581-1584.
- [15] Zhou J, Yoshitomi H, Liu T, et al. Isoquercitrin activates the AMP-activated protein kinase (AMPK) signal pathway in rat H4IIE cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 42.
- [16] Ahn J, Lee H, Kim S, et al. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(4): 545-549.
- [17] Babujanathanam R, Kavitha P, Pandian M R. Quercitrin, a bioflavonoid improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2010, 24(3): 357-364.
- [18] Voss C M, Pajęcka K, Stridh M H, et al. AMPK activation affects glutamate metabolism in astrocytes [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(12): 2431-2442.
- [19] Wei S, Li W, Yu Y, et al. Ginsenoside compound ksuppresses the hepatic gluconeogenesis via activating adenosine-5' monophosphate kinase: A study *in vitro* and *in vivo* [J]. *Life Sci*, 2015, 139: 8-15.
- [20] 陈琳, 陆明, 曹玉莉, 等. 黄秋葵多糖调节 PEPCK 和 AMPK 表达抑制高脂饮食小鼠肝糖异生 [J]. *疑难病杂志*, 2017, 16(3): 287-292.

## 丹参注射液对 Ang II 诱导 NRK-52E 细胞损伤的保护作用

阮旭<sup>1</sup>, 杨晔<sup>1,2</sup>, 徐仲儒<sup>1</sup>, 尹登科<sup>1,2\*</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽合肥 230012; 2. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 安徽合肥 230012)

**摘要:** 目的 考察丹参注射液对血管紧张素 II (Ang II) 诱导肾小管上皮细胞 (NRK-52E 细胞) 损伤的保护作用。方法 将 NRK-52E 细胞分为对照组、模型组 (Ang II)、丹参注射液组 (Ang II + 丹参注射液), MTT 法检测其增殖, 免疫荧光法与 Western blot 法分别检测 PI3K、p-PI3K 蛋白表达。结果 与对照组比较, Ang II 作用 24 h 后可显著抑制细胞增殖及 PI3K、p-PI3K 蛋白表达, 而丹参注射液均能加以恢复。结论 丹参注射液能减轻 Ang II 对 NRK-52E 细胞的损伤作用, 其机制可能与激活 PI3K/Akt 信号通路有关。

**关键词:** 丹参注射液; Ang II; NRK-52E 细胞; PI3K; p-PI3K

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)05-1170-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.035

糖尿病肾病的发病机制相当复杂, 其中肾素-血管紧张素系统 (RAS) 的激活是导致其发生与发展的重要原因<sup>[1-3]</sup>。大量研究表明, 糖尿病患者肾脏局部 RAS 易被激活而产生大量 Ang II, 由于其与胰岛素之间具有共同的信号通路, 可通过激活 AT1 受体来抑制 PI3K/Akt 途径, 影响下游 PI3K、PKB 等信号蛋白的活性, 从而启动胰岛素抵抗, 最终发展为糖尿病肾病<sup>[4-5]</sup>。

丹参具有抗炎、抗氧化、抗凝血及免疫调节等药理作用, 同时丹参注射液单用及与其他药物联用在临床上治疗糖尿病肾病方面取得了良好的效果<sup>[6-9]</sup>, 前期课题组研究表明, 它可有效改善糖尿病肾病大鼠肾小管结构和功能<sup>[10]</sup>。本实验将在细胞水平检测丹参注射液对 Ang II 诱导 NRK-

52E 细胞损伤的保护作用, 并观察其对 PI3K 和 p-PI3K 表达的影响, 从而为相关临床研究提供理论基础。

### 1 材料

1.1 细胞株 大鼠肾小管上皮细胞 (NRK-52E 细胞) 购于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 试剂 丹参注射液 (生药量 2 g/mL, 批号 1511101) 购于正大青春宝药业有限公司。血管紧张素 II (Ang II) 购于上海源叶生物科技有限公司; 四甲基偶氮唑 (MTT) 购于美国 Sigma 公司; PI3K 鼠单克隆抗体、p-PI3K 兔多克隆抗体购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; 胎牛血清购于德国 Serana 公司; DMEN 低糖培养基购于美国 Hyclone 公司。

1.3 仪器 CO<sub>2</sub> 培养箱购于苏州贝茵医疗器械有限公司;

收稿日期: 2017-08-26

基金项目: 国家自然科学基金 (81102682); 安徽省自然科学基金 (1708085MH216)

作者简介: 阮旭 (1993—), 男, 硕士生, 从事中药抗糖尿病研究。E-mail: 737577050@qq.com

\* 通信作者: 尹登科 (1977—), 男, 教授, 从事生物体活性成分及作用机制研究。Tel: 15156890963, E-mail: yindengke@sina.com