

异搏定通过抑制 TXNIP 介导的细胞凋亡和炎症减轻高脂喂养小鼠的糖尿病前期神经病变

叶 婷 阿克拜尔·乌普 岳薇薇 马 丽

摘 要 **目的** 探究异搏定对糖尿病小鼠前期神经病变的影响及机制。**方法** 30 只 C57BL/6 小鼠分为对照组、模型组和异搏定组,模型组和异搏定组高脂喂养构建糖尿病前期神经病变模型,给药治疗 30 天,给药期间监测血糖变化;给药结束后检测各组小鼠坐骨神经传导速度;HE 染色观察坐骨神经组织病理变化;Elisa 和 RT-qPCR 分别检测小鼠血清和坐骨神经组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平;原位缺口末端转移酶标记法(TUNEL)检测各组小鼠坐骨神经细胞凋亡;Western blot 法检测各组小鼠坐骨神经组织 TXNIP 和 NLRP3 表达水平。**结果** 相比于模型组,异搏定组小鼠给药期间血糖水平显著下降($P < 0.05$),坐骨神经组织病变显著改善,血清和坐骨神经组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平显著下降($P < 0.05$),细胞凋亡率显著下降($P < 0.05$);TXNIP 和 NLRP3 表达显著下调($P < 0.05$)。**结论** 异搏定能够缓解高脂喂养小鼠的糖尿病前期神经病变,其机制为抑制 TXNIP 的表达而调控炎症反应及细胞凋亡。

关键词 糖尿病 神经病变 炎症 细胞凋亡

中图分类号 R587.2; R747.9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.04.024

Isoprofen Reduces Pre-diabetic Neuropathy in High-fat-fed Mice by Inhibiting TXNIP-mediated Apoptosis and Inflammation.

Ye Ting, Akebaier · Wupu, Yue Weiwei, et al. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Xinjiang 830001, China

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of verapamil on neuropathy in diabetic mice. **Methods** Thirty C57BL/6 mice were divided into control group, model group and Isoprofen group. Model group and Isoprofen group were fed with high-fat diet to construct pre-diabetic neuropathy model. The drug was treated for 30 days. After the end of drug administration, the sciatic nerve conduction velocity of each group was detected. HE staining was used to observe the pathological changes of sciatic nerve tissue. Elisa and RT-qPCR were used to detect the expression levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in mouse serum and sciatic nerve tissue, respectively. In situ nick end transferase labeling (TUNEL) was used to detect the apoptosis of sciatic nerve cells in each group. The expression of TXNIP and NLRP3 in sciatic nerve tissues of each group was detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the blood glucose level of the mice in the Isoprofen group decreased significantly ($P < 0.05$), the lesions of the sciatic nerve tissue were significantly improved, and the expression levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum and sciatic nerve tissues were compared. Significantly decreased ($P < 0.05$), apoptosis rate decreased significantly ($P < 0.05$). TXNIP and NLRP3 expression were significantly down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Isoprofen can alleviate pre-diabetic neuropathy in high-fat-fed mice by inhibiting the expression of TXNIP and regulating inflammation and apoptosis.

Key words Diabetes; Neuropathy; Inflammation; Apoptosis

糖尿病是一种由于胰岛素分泌异常而引起高血糖的代谢性疾病,是并发症最多的一种疾病,主要症状为多饮、多食、多尿、体重下降,长期高血糖会导致严重的心脏、脑、肾脏、眼以及神经系统的病变^[1]。糖尿病患者中约有 10% 在初次诊断时就已经伴有神经损伤,包括触觉、温觉、痛觉等损伤^[2]。并且已有

研究表明糖尿病前期也会出现神经病变^[3]。但是临床上并没有有效的方式来治疗糖尿病前期神经病变,因此寻找有效的糖尿病前期神经病变治疗药物对于糖尿病的治疗至关重要。异搏定又称维拉帕米是用于治疗心血管疾病的有效药物,目前已有临床研究表明异搏定能够增强胰岛素的分泌,或可用于糖尿病的治疗^[4]。但其对糖尿病前期神经病变的影响及机制尚未报道。本研究探究了异搏定对高脂喂养小鼠的糖尿病前期神经病变的影响,旨在为糖尿病前期神经病变治疗提供帮助。

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2018D01C020)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆医科大学附属中医医院内分泌科

通讯作者:马丽,电子信箱:sghtkorean@163.com

材料与方法

1. 材料: C57BL/6 小鼠, 高脂饲料(卡文斯实验动物有限公司); 链脲佐菌素(STZ)(索莱宝生物科技有限公司); 维拉帕米片(广东华南药业集团有限公司); TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 检测试剂盒(福麦斯生物技术有限公司); ACCU-CHEK Advantage 血糖仪、血糖试剂条(德国罗氏公司); TUNEL 凋亡试剂盒(美国 Solarbio 公司); 反转录试剂盒、qPCR 检测试剂盒(爱必梦生物技术有限公司); GAPDH、TXNIP、NLRP3 抗体、山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司)。

2. 糖尿病前期神经病变小鼠造模及给药: 4 周龄 C57BL/6 小鼠分为对照组、模型组和异搏定组, 对照组给予正常饮食, 模型组和异搏定组小鼠给予高脂饮食, 每两周尾静脉采血, 利用血糖仪检测血糖变化; 与对照组比较, 模型组和异搏定组小鼠首次出现显著高血糖时检测模型组小鼠坐骨神经传导速度, 选定神经传播速度显著降低的小鼠作为糖尿病前期神经病变模型。对照组选用 10 只健康的 C57BL/6, 模型组和异搏定组各选 10 只糖尿病前期神经病变小鼠, 异搏定组小鼠灌胃给予异搏定, 剂量为 0.5 g/kg, 2 次/天, 对照组和模型组小鼠给予等体积的 0.9% 氯化钠溶液, 给药 30 天, 每 5 天检测各组小鼠血糖水平。

3. 坐骨神经传导速度的测定: 给药结束后, 腹腔注射水合氯醛麻醉小鼠, 使用生理记录仪检测坐骨神经传导速度(MNCV), 在右侧坐骨切迹插入刺激电极, 在踝部(远端)和左足底第 2 趾间分别插入记录电极, 记录双通道复合动作电位, 以两对记录电极间距离 S(mm)除以两通道复合动作电位潜伏期之差 Δt (ms)来计算 MNCV。每间隔 1min, 重复电刺激 3 次, 取其平均值, 计算 MNCV。

4. HE 染色检测各组小鼠坐骨神经病理变化: 给药结束后, 解剖小鼠取坐骨神经组织, 于组织固定液中固定 24h, 固定后将组织用梯度乙醇脱水、透明、石蜡包埋后制成组织切片, 然后将石蜡切片进行透明水化, 经过苏木精-伊红染色、封片后于显微镜下拍照, 观察组织病理变化。

5. Elisa 检测各组小鼠血清炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平: 给药结束后, 各组小鼠眼眶取血, 室温静置 1h 后, 3500r/min, 4℃ 离心 15min, 取上层血清, 按照 Elisa 试剂盒方法检测血清炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, 主要步骤为铺好一抗的 96 孔板内加入 40 μ l 待测样品和 10 μ l 生物素标记抗

体后, 再加入 100 μ l 辣根过氧化物酶标记抗体, 37℃ 孵育 75min, 清洗 96 孔板后加入显色剂显色, 终止后于 450nm 波长处测吸光度, 根据标准曲线计算血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量。

6. 原位缺口末端转移酶标记法(TUNEL)检测各组小鼠坐骨神经细胞凋亡: 给药结束后, 解剖小鼠取坐骨神经组织, 于组织固定液中固定 24h 后制备石蜡切片, 将制备好的石蜡切片经常规二甲苯及各梯度乙醇脱蜡至水, 然后蒸馏水水化 5min 后, 用 0.1mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中进行热修复, 分别经过 3% H₂O₂ 甲醇液、0.1% TritonX-100、20% 牛血清、TUNEL 反应混合液、POD 转化剂孵育及 PBS 冲洗后, DAB 溶液显色, 并在显微镜下观察, 终止后用迈耶苏木精染核, PBS 冲洗后, 甘油封片剂封片, 显微镜下观察并计算坐骨神经凋亡细胞数目。

7. RT-qPCR 检测各组小鼠坐骨神经组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达: 给药结束后, 取各组小鼠坐骨神经组织, 立刻置于液氮中保存。取液氮保存小鼠坐骨神经组织加入 Trizol 研磨至组织完全裂解, 取研磨液加入 200 μ l 氯仿, 静置 5min 后, 于 12000 $\times$ g, 4℃ 离心 15min, 转移上层水相, 加入 500 μ l 异丙醇, 12000 $\times$ g, 4℃ 离心 10min, 去上清, 1ml 75% 乙醇清洗 RNA 沉淀后, 20 μ l RNA-free 水重悬 RNA 沉淀, 55℃ 水浴 10min, 即为总 RNA。使用 primer premier5.0 软件设计 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 引物, 按照 cDNA 合成试剂盒和 RT-qPCR 试剂盒进行反转录和 RT-qPCR, 采用 $\Delta\Delta$ CT 法计算 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达量。

8. Western blot 法检测各组小鼠坐骨神经组织 TXNIP 和 NLRP3 表达水平: 取各组小鼠坐骨神经组织, 加入 Trizol 研磨均匀, 然后加入 1.5ml 的异丙醇, 12000 $\times$ g, 4℃ 离心 10min, 去上清, 用蛋白清洗液清洗 3 次后, 用 1% 的 SDS 溶液重悬沉淀, 即为总蛋白。BCA 蛋白定量后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 用 5% 的脱脂牛奶对 PVDF 膜封闭 2h, 然后以稀释后的 GAPDH、TXNIP、NLRP3 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜后二抗室温孵育 1.5h, 再用 TBST 洗膜后按照 ECL 试剂盒说明书配置发光液, 并将 PVDF 膜浸入发光液中反应 0.5min, 曝光并拍照, 用 Image J 软件曝光结果进行定量分析。

9. 统计学方法: 采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析, 所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间差异使用方差分析(One-way ANOVA), 两

组间比较采用 *LSD* 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 给药期间各组小鼠血糖变化:模型组小鼠血糖水平显著高于对照组小鼠血糖水平 ($P < 0.05$),异搏定组小鼠血糖水平显著低于模型组小鼠血糖水平 ($P < 0.05$),详见图 1。

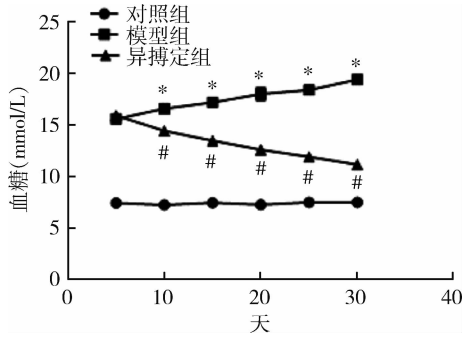


图 1 给药期间各组小鼠血糖变化

与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$

2. 异搏定对糖尿病前期神经病变小鼠坐骨神经传导速度的影响:给药后各组小鼠坐骨神经传导速度

检测结果详见表 1,与对照组比较,模型组小鼠坐骨神经传导速度显著下降 ($P < 0.05$);而异搏定组小鼠坐骨神经传导速度显著高于模型组 ($P < 0.05$)。

表 1 给药后各组小鼠 MNCV 检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	MNCV (m/s)
对照组	38.54 ± 0.92
模型组	28.86 ± 1.16 *
异搏定组	34.92 ± 1.55 **

与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$

3. 异搏定对糖尿病前期神经病变小鼠坐骨神经组织病理变化影响:根据 HE 染色结果,对照组小鼠坐骨神经纤维排列整齐,组织结构完整,纤维形状规则,髓鞘颜色均匀,没有病理变化;模型组小鼠坐骨神经结构紊乱,纤维细胞排列不均匀,髓鞘显著变薄且分布不均匀,轴索变细甚至收缩,病理变化显著;异搏定组小鼠坐骨神经组织病变显著缓解,纤维细胞排列较整齐,组织结构损伤显著缓解,髓鞘颜色均匀(图 2)。

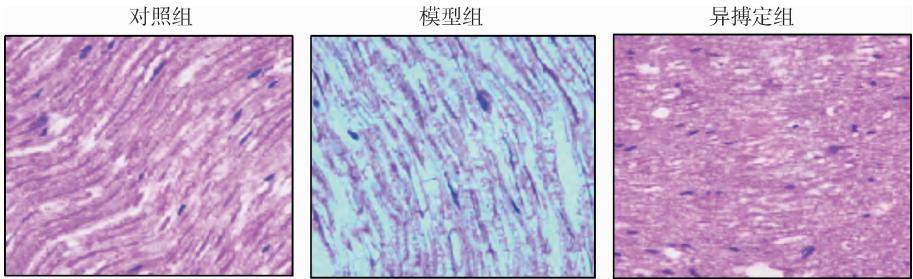


图 2 各组小鼠坐骨神经组织 HE 染色结果 ($\times 200$)

4. 异搏定对糖尿病前期神经病变小鼠血清炎性因子的影响:Elisa 检测各组小鼠血清炎性因子结果显示,模型组小鼠血清炎性因子 $\text{TNF} - \alpha$ 、 $\text{IL} - 1\beta$ 、 $\text{IL} - 6$ 显著高于对照组 ($P < 0.05$);而与模型组比较,异搏定组小鼠血清炎性因子 $\text{TNF} - \alpha$ 、 $\text{IL} - 1\beta$ 、 $\text{IL} - 6$ 显著下降 ($P < 0.05$,表 2)。

表 2 给药后各组小鼠血清炎性因子 $\text{TNF} - \alpha$ 、 $\text{IL} - 1\beta$ 、 $\text{IL} - 6$ 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	$\text{TNF} - \alpha$ 相对表达量	$\text{IL} - 1\beta$ 相对表达量	$\text{IL} - 6$ 相对表达量
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	8.14 ± 0.72 *	5.99 ± 0.35 *	8.89 ± 0.63 *
异搏定组	4.08 ± 0.64 **	2.65 ± 0.46 **	3.74 ± 0.48 **

与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$

5. 异搏定对糖尿病前期神经病变小鼠坐骨神经细胞凋亡的影响:TUNEL 法检测各组小鼠坐骨神经组织细胞凋亡结果显示,与对照组比较,模型组小鼠坐骨神经细胞凋亡显著增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,异搏定组小鼠坐骨神经细胞凋亡显著缓解 ($P < 0.05$,表 3)。

表 3 给药后各组小鼠坐骨神经细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	细胞凋亡率 (%)
对照组	16.88 ± 1.00
模型组	30.03 ± 1.48 *
异搏定组	23.80 ± 1.95 **

与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$

6. 异搏定对糖尿病前期神经病变小鼠坐骨神经组织炎症因子表达影响: RT-qPCR 检测结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠坐骨神经组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平显著上调 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 异搏定组小鼠坐骨神经组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平显著下调 ($P < 0.05$, 表 4)。

表 4 给药后各组小鼠坐骨神经组织炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, ng/L)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
对照组	6.46 $\pm$ 0.46	3.70 $\pm$ 0.37	1.99 $\pm$ 0.21
模型组	15.96 $\pm$ 1.00 *	7.48 $\pm$ 0.44 *	5.80 $\pm$ 1.01 *
异搏定组	9.82 $\pm$ 0.93 **	5.10 $\pm$ 0.47 **	3.86 $\pm$ 0.29 **

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

7. 异搏定对各组小鼠坐骨神经组织 TXNIP、NLRP3 表达影响: Western blot 法检测结果显示, 模型组小鼠坐骨神经 TXNIP、NLRP3 表达量显著上升 ($P < 0.05$), 而异搏定组小鼠坐骨神经组织 TXNIP、NLRP3 表达量显著降低 ($P < 0.05$, 图 3, 表 5)。

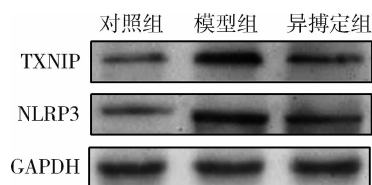


图 3 各组小鼠坐骨神经组织 TXNIP、NLRP3 表达结果

表 5 各组小鼠坐骨神经组织 TXNIP、NLRP3 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	TXNIP 相对表达量 (%)	NLRP3 相对表达量 (%)
对照组	39.54 $\pm$ 2.12	30.40 $\pm$ 1.94
模型组	82.31 $\pm$ 7.68 *	71.07 $\pm$ 4.84 *
异搏定组	55.98 $\pm$ 5.62 **	44.29 $\pm$ 3.91 **

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

讨 论

糖尿病是一种由于胰岛素分泌缺陷或胰岛素作用障碍所致的代谢性疾病, 并且长期高血糖会引发多种糖尿病并发症, 导致多器官衰竭及糖尿病晚期神经系统严重病变, 发生率可达 85%, 主要表现为肢端麻木、感觉异常、痛觉过敏、触觉异常、腱反射减弱或消失等^[5,6]。目前临床上的治疗方法主要为控制血糖、阵痛治疗以及提供神经营养物质等, 但治疗效果并不显著。近年来, 逐渐有研究表明, 糖尿病在发病初期就已经伴随着神经病变^[7]。若在糖尿病发病

初期就能采取治疗, 抑制神经病变的发展, 对于糖尿病并发症的治疗至关重要。异搏定是一种用于心血管疾病治疗的药物, 但是逐渐有研究报道异搏定可用于糖尿病的预防和治疗^[8]。然而异搏定对糖尿病前期神经病变的影响尚无明确报道, 本研究通过构建糖尿病前期神经病变小鼠模型, 发现异搏定能够显著缓解糖尿病小鼠高血糖以及坐骨神经损伤。

炎性反应与糖尿病密切相关^[9]。“糖尿病炎症学说”认为, 糖尿病患者中的胰岛素分泌缺陷和胰岛素抵抗是由组织炎症所引起的^[10]。并且大部分糖尿病患者均伴有体内严重的炎性反应^[11]。有研究指出控制体内炎症可缓解糖尿病的进程, 并且炎性反应也会引起神经系统结构的破坏, 神经组织炎症因子浸润会引起剧烈疼痛, 尽管糖尿病前期神经病变不严重, 但经过长期的积累会造成严重的神经组织病变, 从而加重糖尿病并发症^[12,13]。所以在糖尿病前期治疗过程中, 神经系统炎性反应的控制也是至关重要的。本研究发现, 异搏定能够显著减低糖尿病小鼠血清中的炎症因子以及坐骨神经组织中炎症因子的表达, 说明异搏定能够通过抑制炎症反应来控制糖尿病以及糖尿病前期神经病变。

神经细胞凋亡是糖尿病前期神经病变的主要病理特征之一, 神经细胞凋亡是引起神经系统病变的主要因素^[14]。细胞凋亡受多种基因共同调控, 在糖尿病发病过程中, 各器官组织均高表达 TXNIP^[15]。并有研究表明, 高血糖和高游离脂肪酸均能够引起 TXNIP 的高表达。TXNIP 在病理刺激下会与 NLRP3 炎性小体结合促进 IL-1 β 分泌增多, 加重炎症反应, 进而导致细胞凋亡增加^[16,17]。本研究发现, 糖尿病前期神经病变小鼠坐骨神经组织中 TXNIP 和 NLRP3 表达量显著上调, 并且坐骨神经组织中细胞凋亡率显著上升, 说明糖尿病前期神经病变与神经组织炎症和细胞凋亡密切相关, 而异搏定给药后小鼠坐骨神经组织中 TXNIP 和 NLRP3 表达量显著下调, 且凋亡率显著下降, 说明异搏定能够通过抑制神经组织 TXNIP 的表达而缓解糖尿病前期神经病变。

综上所述, 异搏定能够显著缓解糖尿病小鼠前期神经病变, 其机制可能是通过抑制 TXNIP 的表达而减轻炎症和细胞凋亡。

参考文献

- 王蕊, 安建立, 朱悦雨, 等. 强化神经营养方案辅助胰岛素对糖尿病周围神经病变患者治疗及预后的影响[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(7): 1412-1417
- 张青. 糖尿病痛性神经病变的中枢神经系统影像学研究进展

- [J]. 医学研究生学报, 2017, 30(10):1116-1120
- 3 朴贞雅, 王丽宏, 傅雪莲, 等. 电流感觉阈值测定发现早期糖尿病周围神经病变的应用探讨[J]. 中国医师杂志, 2018, 20(6): 941-943
- 4 药品资讯网. 维拉帕米有望成为治疗 1 型糖尿病的新药[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 35:200
- 5 Tabák AG, Herder C, Rathmann W, *et al.* Prediabetes: a high-risk state for diabetes development[J]. Lancet, 2012, 379(9833): 2279-2290
- 6 Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, *et al.* Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments[J]. Lancet Neurol, 2012, 11(6): 521-534
- 7 Lupachyk S, Watcho P, Obrosoff AA, *et al.* Endoplasmic reticulum stress contributes to prediabetic peripheral neuropathy[J]. Exp Neurol, 2013, 247(3):342-348
- 8 余薇, 汪晶晶, 文重远, 等. 维拉帕米对链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及机制[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(42):3003-3007
- 9 Sung KC, Lee MY, Kim YH, *et al.* Obesity and incidence of diabetes: effect of absence of metabolic syndrome, insulin resistance, inflammation and fatty liver[J]. Atherosclerosis, 2018, 275:50-57
- 10 杨立勇. 低度慢性炎症与 2 型糖尿病[J]. 中国糖尿病杂志, 2013, 5(9):527-530
- 11 Eguchi K, Nagai R. Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology[J]. J Clin Invest, 2017, 127(1):14-23
- 12 Mou Z, Feng Z, Xu Z, *et al.* Schisandrin B alleviates diabetic neuropathy through suppressing excessive inflammation and oxidative stress[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508(1):243-249
- 13 Pouvreau C, Dayre A, Butkowski EG, *et al.* Inflammation and oxidative stress markers in diabetes and hypertension[J]. J Inflamm Res, 2018, 11:61-68
- 14 熊英琼, 胡凡, 潘婕, 等. 电流感觉阈值在糖尿病周围神经病变诊断中的评价[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2017, 43(10): 582-585
- 15 Devi TS, Hosoya K, Terasaki T, *et al.* Critical role of TXNIP in oxidative stress, DNA damage and retinal pericyte apoptosis under high glucose: implications for diabetic retinopathy[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(7):1001-1012
- 16 Li Y, Li J, Li S, *et al.* Curcumin attenuates glutamate neurotoxicity in the hippocampus by suppression of ER stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in a manner dependent on AMPK[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 286(1):53-63
- 17 Chen W, Zhao M, Zhao S, *et al.* Activation of the TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway contributes to inflammation in diabetic retinopathy: a novel inhibitory effect of minocycline[J]. Inflamm Res, 2017, 66(2):157-166

(收稿日期:2019-08-17)

(修回日期:2019-09-24)

粉防己碱对人视网膜母细胞瘤细胞株 S0-Rb50 增殖凋亡影响的可能机制研究

马高恩 焦云娟 贺琳 刘向玲

摘要 **目的** 观察粉防己碱(tetrandrine, Tet)通过磷脂酰肌醇-3 激酶(PI₃K)/蛋白激酶 B(Akt)通路对人视网膜母细胞瘤细胞株 S0-Rb50 增殖及凋亡的影响。**方法** 对数期生长 S0-Rb50 细胞分为 4 组,即对照组、Tet 低、中、高剂量组,分别用 0、2.5、5.0、10.0 μmol/L Tet 处理,观察干预 24h 细胞形态学变化;MTT 法检测干预 24、48、72h 时各组吸光度(A)值;流式细胞术检测干预 24h 各组细胞周期及细胞凋亡率;实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法检测干预 24h 各组细胞 PI₃K、Akt、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)mRNA 和蛋白表达量及裂解的含半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 3(cleaved caspase-3)蛋白表达量。**结果** 倒置相差显微镜观察发现,对照组细胞形态规则、融合成片,不同干预组细胞随 Tet 浓度升高细胞体积逐渐减小、核质比例减小,不能融合成片,视野内漂浮细胞或细胞崩解碎片增多。与对照组比较, Tet 高剂量组干预 24h 时 A 值较低,差异有统计学意义($P < 0.05$), Tet 各剂量组干预 48、72h 时 A 值均较低,且随干预剂量升高呈降低趋势,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。对照组 MTT 试验 A 值随干预时间的延长呈升高趋势($P < 0.05$), Tet 高剂量组 MTT 试验 A 值随干预时间的延长无明显变化($P > 0.05$)。与对照组比较, Tet 各剂量组 G₀/G₁-S 期细胞占比、PI₃K、Bcl-2 mRNA 和蛋白相对表达量及 pAkt/Akt 较低,且随干预剂量升高呈降低趋势,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较, Tet 各剂量组 G₂/M 期细胞占比、凋亡率、Bax

基金项目:河南省医学科技攻关计划(201602159)

作者单位:453003 新乡医学院第三附属医院眼一科(马高恩、刘向玲);453003 新乡医学院病理教研室(焦云娟);453003 新乡医学院眼科医院眼科(贺琳)

通讯作者:焦云娟,电子邮箱:jiaoyunjuan1122@163.com