

清润方对糖尿病大鼠肝脏 $PI_3K/AKT/mTOR$ 信号的影响

邱宗林 王秋虹 孙丰卉 王 泽 林 兰

摘 要 **目的** 研究清润方对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠 $PI_3K/AKT/mTOR$ 信号通路的影响。**方法** 采用脂肪乳灌胃和腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 建立 2 型糖尿病胰岛素抵抗模型。将大鼠随机分成空白对照组、模型组、清润方大剂量组 $[11.2g/(kg \cdot d)]$ 、清润方中剂量组 $[5.6g/(kg \cdot d)]$ 、清润方小剂量组 $[2.8g/(kg \cdot d)]$ 、二甲双胍组 $[250mg/(kg \cdot d)]$ 。各组均灌胃给药。每天 1 次,连续 8 周。干预后检测血清中血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL-C) 和高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL-C), 检测肝组织中 p-AKT、p-PTEN 及 p70S6K 的 mRNA 以及蛋白表达水平。**结果** 与模型组比较,清润方大剂量组和二甲双胍组的 TC、TG 和 LDL-C 降低, HDL-C 升高 ($P < 0.05$)。清润方大剂量组的 AKT 和 PTEN 的 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), p70S6K 的 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$), 与模型组比较,清润方大剂量组的 p-AKT 和 p-PTEN 的蛋白表达升高 ($P < 0.05$), p-p70S6K 的蛋白表达下降 ($P < 0.05$)。**结论** 清润方可能通过 $PI_3K/AKT/mTOR$ 信号通路来改善胰岛素抵抗。

关键词 清润方 2 型糖尿病 胰岛素抵抗 $PI_3K/AKT/mTOR$ 信号通路

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.12.010

Effect of Qingrunfang on Signal Pathway of $PI_3K/AKT/mTOR$ in Liver of Diabetic Rats. Qiu Zonglin, Wang Qiuhong, Sun Fenghui, et al. Guanganmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Abstract **Objective** To study the effect of Qingrunfang on signal pathway of $PI_3K/AKT/mTOR$ of rat with diabetes mellitus. **Methods** The rats with diabetes mellitus were induced by intraperitoneal injection of streptozotocin and feeding with fat milk for 30 days. Rats with diabetes were randomly divided into five groups, Qingrunfang high dosage groups, Qingrunfang middle dosage groups, Qingrunfang low dosage groups, metformin group and model group. other normal rats were made as control group. After 8 weeks, TC, TG, LDL-C and HDL-C were measured. qRT-PCR way used to observe mRNA expression of AKT, PTEN and p70S6K. Western blot test way used to observe protein expression of p-AKT, p-PTEN and p-p70S6K. **Results** Compared with the model group, the levels of TC, TG and LDL-C were decreased in the Qingrunfang high dosage groups ($P < 0.05$). The levels of HDL-C were increased in the Qingrunfang high dosage groups ($P < 0.05$). The mRNA expression of AKT and PTEN were increased in qingrunfang high dosage groups ($P < 0.05$). The mRNA expression of p70S6K were decreased in the high dosage groups ($P < 0.05$). The protein expression of p-AKT and p-PTEN were increased in qingrunfang high dosage groups ($P < 0.05$). The protein expression of p-p70S6K were decreased in the high dosage groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Qingrunfang may improve the insulin resistance and lipid metabolism by $PI_3K/AKT/mTOR$ signal pathway.

Key words Qingrunfang; Diabetes mellitus; Insulin resistance; $PI_3K/AKT/mTOR$; Signal pathway

糖尿病是世界范围内主要的慢性非传染性疾病,所带来的健康负担巨大,是导致心血管疾病的重要因素之一。超过 75% 的 2 型糖尿病患者血脂代谢异常,主要机制与胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 有关^[1]。近年来研究发现,磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI_3K)/丝/苏氨酸蛋白激酶 (AKT)/哺乳动物雷帕

霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路参与多种机体的生命活动,包括细胞的生存和凋亡,糖尿病肾病和胰岛素抵抗等^[2]。还有研究发现抑制 $PI_3K/AKT/mTOR$ 信号通路会引起脂肪积累减少、脂肪酸氧化增加和脂肪细胞减少^[3]。中医药在治疗糖尿病方面疗效显著,清润方是中国中医科学院广安门医院林兰教授治疗糖尿病三型辨证中阴虚热盛的一种中药复方,主要由黄柏、酒大黄和知母等组成,临床疗效确切^[4]。动物实验表明,清润方在改善糖尿病大鼠血糖和胰岛素抵抗方面有一定的效果^[5]。本研究从清润方对糖尿病

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81573792)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院

通讯作者:林兰,电子信箱:linlan@163.com

大鼠肝脏中 PI₃K/AKT/mTOR 信号通路的影响去探讨清润方改善胰岛素抵抗及血脂代谢异常的机制,为临床应用提供理论依据。

材料与方法

1. 实验材料:(1)实验动物:健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 90 只,体重 180 ± 20 g,12 周龄,购自维通利华实验动物科技有限公司。(2)试验药物:清润方颗粒剂由广安门医院颗粒药房配制,由知母,黄柏和酒大黄等配制。盐酸二甲双胍(格华止)购自中美上海施宝贵有限公司。(3)试剂与仪器:链脲佐菌素(STZ,B57218)购自美国 Sigma 公司。氯仿和异丙醇等均购于北京化学试剂厂,血脂 4 项的试剂购自英科新创(厦门)科技有限公司。qPCR 试剂盒 SYBR FAST qPCR Kit Master Mix(2 ×) Universal 购自美国 KAPA Biosystems 公司。AKT 抗体购自英国 Abcam 公司,PTEN 抗体购自英国 Abcam 公司,p70S6K 抗体购自英国 Abcam 公司,actin 抗体购自英国 Abcam 公司。日本奥林巴斯株式会社全自动生化仪 AU480,高速冷冻离心机:Beckman Allgre 21R 购自美国 Beckman 公司,凝胶成像仪:BioSens SC 810B 购自上海山富科学仪器有限公司,分光光度计:UV-2000 购自上海菁华科技有限公司,实时定量 PCR 仪:ABI7500 购自美国 ABI 公司。

2. 试验方法:(1)动物模型的制备和分组:所有动物饲养于广安门医院动物房,饲养条件为 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40% ~ 60%。实验室自然采光,通风良好,照明昼夜明暗交替周期为 12h。所有大鼠自由摄食、饮水。脂肪乳的制备:猪油(20%)、丙硫氧嘧啶(1%)、胆固醇(5%)、谷氨酸钠(1%)、蔗糖(5%)、果糖(5%)、食用盐(6%)溶于 Tween80(20%)和丙二醇(30%)中。加水定量配制成脂肪乳。造模前先用基础饲料适应性饲养 1 周。明暗周期 12h/12h,自由摄食、饮水。随机选 15 只饲以基础饲料为空白对照组,余 75 只为实验模型组。将 Wistar 大鼠灌胃脂肪乳 10 天,灌胃量为 $10\text{ml}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。动物禁食不禁水 12h 后腹腔注射链脲佐菌素(STZ) $40\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, (STZ 溶于 0.1mol/L 新鲜配制的枸橼酸钠缓冲液中,pH 值 4.2),共连续注射 2 天,每次腹腔注射链脲佐菌素后 15min,给大鼠腹腔注射胰岛素 0.4U,2.5h 和 5h 后灌胃给予 25% 葡萄糖 $10\text{ml}/\text{kg}$ 。最后一次注射链脲佐菌素后 72h 监测血糖。空腹血糖 $\geq 16.7\text{mmol}/\text{L}$ 作为糖尿病大鼠。继续灌胃脂肪乳 $10\text{ml}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,共灌胃 30 天。将造模成功的 60

只实验动物随机分为模型组、清润方小、中、大剂量组,二甲双胍组。(2)动物处理:成模后先灌胃脂肪乳 30 天,然后灌胃给药,1 次/天,均在每天相同时间灌服,连续 8 周。按照体表面积法换算人-大鼠的药物剂量,清润方大、中、小剂量组分别按成人剂量的 14、7、3.5 倍给药。清润方大剂量组 $[11.2\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 、清润方中剂量组 $[5.6\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 、清润方小剂量组 $[2.8\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 。空白对照组和模型对照组给予蒸馏水灌服。阳性对照组予二甲双胍 $[250\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 混悬液灌胃。(3)标本采集与处理:实验结束前 1 天傍晚开始,所有大鼠禁食不禁水。第 2 天上午才用 10% 的水合氯醛溶液以腹腔注射麻醉后,腹主动脉取血。取血后,各组大鼠剥离出完整的肝脏组织,迅速摘取肝组织保存于液氮中。血液标本离心后取血清。(4)生化仪检测血清中的 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 的含量。(5)qRT-PCR 法检测清润方对糖尿病大鼠肝脏组织中 AKT、PTEN 及 p70S6K 基因表达的影响:Trizol 法提取各组肝组织样本中的总 RNA,紫外分光光度仪测定 RNA 的含量。参照反转录试剂盒说明完成反转录反应。引物序列:AKT 上游引物:5'-TCAGGTGCTGAGGAGATGGA-3',下游引物:5'-CTTGGCAACGATGACCTCCT-3'。PTEN 上游引物:5'-TGTGGTCTGCCAGCTAAAGG-3',下游引物:5'-AGGTTTCCTCTGGTCCTGGT-3'。P70S6K 上游引物:5'-GGTCACGTGAAGCTGACAGA-3',下游引物:5'-CCCAGACTCCACCAATCCAC-3'。Actin 上游引物:5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3',下游引物:5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'。参照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明完成荧光定量 PCR 的扩增。PCR 扩增体系 $20\mu\text{l}$,包括 SYBR Master Mix(2 ×) Universal $10\mu\text{l}$,上游引物 $1.5\mu\text{l}$,下游引物 $1.5\mu\text{l}$,cDNA 模板 $3\mu\text{l}$,再加 ddH₂O 至终体积 $20\mu\text{l}$ 。在 95°C 10min 后,进行 40 个循环扩增。每个循环扩增包括 95°C 10s、 59°C 60s。溶解曲线设为 95°C 15s、 72°C 15s、 95°C 15s,一个循环。结果以 β -actin 为内参对照,每个样本重复 5 次,记录 Ct 值,取平均值。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行数据的相对定量分析。根据 Ct 值,计算 AKT、PTEN 和 p70S6K 基因的相对表达量。(6)Western blot 法检测清润方对糖尿病大鼠肝脏组织中 p-AKT、p-PTEN 及 p-p70S6K 等蛋白表达的影响:将提取的肝组织置于缓冲液(RIPA:PMSF = 500:1)中,于玻璃匀浆器中制成匀浆,冰上孵育,超声处理,离心,提取组织蛋白。将样本定量于 $20\mu\text{l}$,凝

胶电泳 90min,然后转膜 90min。转膜后,用 5% 的低脂蛋白封闭液封闭 1h,用 5% BSA - TBST 稀释鼠单克隆抗体 p - AKT(1: 1000),4℃ 水平摇床孵育过夜。次日洗膜,TBST 洗 3 次,每次 10min。用 5% BSA - TBST 稀释二抗,山羊抗鼠 IgG(H + L)HRP 1: 10000,室温孵育 40min。洗膜:TBST 洗膜 3 次,每次 10min。ECL 滴加到膜的蛋白面,反应 3min,胶片曝光。图片扫描后,使用软件为 Gel Image system ver. 4. 00 对图像进行灰度分析。采用 β - actin 作为内参对照,同样的方法测定 p - PTEN 及 p - p70S6K 的蛋白浓度。实验重复 3 次。

3. 统计学方法:采用 SPSS 18. 0 统计学软件进行统计分析,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较用方差分析。两两比较方差时用 *LSD* 检

验,方差不齐时用 *Dunnett's T3* 检验,以 $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠一般状况:空白对照组大鼠状态较好,体重持续增长,活动正常,反应灵敏,毛色光滑,尿量正常。造模后成模的大鼠出现明显的多饮、多食及多尿症状,体重增长缓慢。精神不振,活动减少,动作迟缓,被毛粗糙。给药 3 周后,清润方大、中、小剂量组与二甲双胍组大鼠的情况有不同程度的改善。

2. 清润方对大鼠血脂代谢的影响:与正常组比较,模型组 TC 升高,TG 升高,LDL - C 升高,HDL - C 降低。与模型组比较,清润方大剂量组和二甲双胍组的 TC、TG 和 LDL - C 降低,HDL - C 升高。说明清润方可以改善糖尿病大鼠的血脂代谢(表 1)。

表 1 清润方对 2 型糖尿病大鼠血脂代谢的影响($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mmol/L}$)

组别	TC	TG	HDL - C	LDL - C
正常组	1. 69 $\pm$ 0. 16	0. 70 $\pm$ 0. 18	1. 87 $\pm$ 0. 08	0. 91 $\pm$ 0. 15
模型组	5. 35 $\pm$ 0. 40 *	2. 96 $\pm$ 0. 65 *	1. 31 $\pm$ 0. 26 *	1. 64 $\pm$ 0. 33 *
清润方小剂量组	4. 50 $\pm$ 0. 51 * Δ	2. 02 $\pm$ 0. 17 * Δ	1. 35 $\pm$ 0. 27 *	1. 07 $\pm$ 0. 13 #
清润方中剂量组	3. 39 $\pm$ 0. 80 * #	2. 38 $\pm$ 1. 25	1. 44 $\pm$ 0. 38	1. 06 $\pm$ 0. 17
清润方大剂量组	3. 62 $\pm$ 0. 58 * # Δ	2. 07 $\pm$ 0. 29 * # Δ	1. 51 $\pm$ 0. 24 * #	0. 88 $\pm$ 0. 17 #
二甲双胍组	2. 10 $\pm$ 0. 15 * #	1. 04 $\pm$ 0. 27 * #	1. 58 $\pm$ 0. 11 * #	0. 95 $\pm$ 0. 24 #

与正常组比较,* $P < 0. 05$;与模型组比较,# $P < 0. 05$;与二甲双胍组比较, $\Delta P < 0. 05$

3. 清润方对肝组织 AKT、PTEN 及 p70S6K 的 mRNA 表达的影响:与正常组比较,模型组的 AKT 和 PTEN 的 mRNA 表达下降($P < 0. 05$),p70S6K 的 mRNA 表达升高($P < 0. 05$)。与模型组比较,清润方大剂量组和二甲双胍组的 AKT 和 PTEN 的 mRNA 表达升高($P < 0. 05$),p70S6K 的 mRNA 表达下降($P < 0. 05$,表 2)。

表 2 AKT、PTEN 及 p70S6K 的 mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	AKT	PTEN	p70S6K
正常组	2. 52 $\pm$ 0. 74	1. 11 $\pm$ 0. 30	0. 64 $\pm$ 0. 16
模型组	0. 63 $\pm$ 0. 41 *	0. 66 $\pm$ 0. 26 *	1. 61 $\pm$ 0. 19 *
清润方小剂量组	1. 74 $\pm$ 0. 44 #	0. 58 $\pm$ 0. 29 *	1. 34 $\pm$ 0. 86
清润方中剂量组	1. 27 $\pm$ 0. 56 * #	0. 77 $\pm$ 0. 43 #	0. 92 $\pm$ 0. 44 * #
清润方大剂量组	1. 11 $\pm$ 0. 52 * #	0. 91 $\pm$ 0. 41 * #	0. 81 $\pm$ 0. 25 * #
二甲双胍组	1. 26 $\pm$ 0. 25 * #	0. 85 $\pm$ 0. 34 * #	0. 70 $\pm$ 0. 24 * #

与正常组比较,* $P < 0. 05$;与模型组比较,# $P < 0. 05$

p - p70S6K 的蛋白表达升高($P < 0. 05$)。与模型组比较,清润方大剂量组和二甲双胍组的 p - AKT 和 p - PTEN 的蛋白表达升高($P < 0. 05$),p - p70S6K 的蛋白表达下降($P < 0. 05$,表 3,图 1)。

表 3 p - AKT、p - PTEN 及 p - p70S6K 的蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	p - AKT	p - PTEN	p - p70S6K
正常组	0. 655 $\pm$ 0. 135	0. 504 $\pm$ 0. 016	0. 287 $\pm$ 0. 025
模型组	0. 363 $\pm$ 0. 094 *	0. 202 $\pm$ 0. 117 *	0. 581 $\pm$ 0. 137 *
清润方小剂量组	0. 552 $\pm$ 0. 066 #	0. 301 $\pm$ 0. 138 *	0. 502 $\pm$ 0. 053 *
清润方中剂量组	0. 577 $\pm$ 0. 092 * #	0. 389 $\pm$ 0. 120	0. 473 $\pm$ 0. 063 * # Δ
清润方大剂量组	0. 536 $\pm$ 0. 069 * #	0. 357 $\pm$ 0. 126 * #	0. 429 $\pm$ 0. 033 * #
二甲双胍组	0. 528 $\pm$ 0. 206 * #	0. 366 $\pm$ 0. 117 * #	0. 367 $\pm$ 0. 026 * #

与正常组比较,* $P < 0. 05$;与模型组比较,# $P < 0. 05$;与二甲双胍组比较, $\Delta P < 0. 05$

讨 论

4. 清润方对肝组织 p - AKT、p - PTEN 及 p - p70S6K 的蛋白表达的影响:与正常组比较,模型组的 p - AKT 和 p - PTEN 的蛋白表达下降($P < 0. 05$),

2 型糖尿病是全球人类健康的主要威胁,社会和经济因素影响糖尿病在人群中的分布和流行,西方的生活方式会造成糖尿病加剧。肥胖、炎性反应等都可

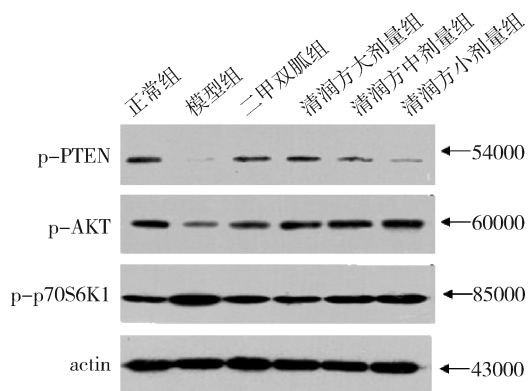


图1 清润方对 p-AKT、p-PTEN 及 p-p70S6K 的蛋白表达的影响

以造成胰岛素抵抗^[6]。糖尿病会造成高血糖和血脂代谢异常,有研究报道能够减少胰岛素信号通路 AKT 损伤的植物提取物可以明显降低糖尿病小鼠的血糖、逆转血脂异常和胰腺损伤^[7]。研究发现,术前口服糖可以通过 PI₃K/AKT/mTOR 信号通路降低术后胰岛素抵抗,改善骨骼肌术后胰岛素敏感度^[8]。抗肌肉生长抑制素多克隆抗体可以通过 PI₃K/AKT/mTOR 信号通路改善饮食诱导的肥胖大鼠的胰岛素抵抗^[9]。

众所周知,在胰岛素的代谢中,PI₃K/AKT 信号通路是一条经典的信号通路,在肝脏、骨骼肌和脂肪组织中对葡萄糖摄取起到重要作用^[10]。降低或者封闭 PI₃K/AKT 通路会使胰岛素的生理效应降低,从而导致胰岛素抵抗^[11]。有研究发现津力达(人参、黄精、麦冬等)可以改善高脂饮食诱导的胰岛素抵抗大鼠的高血糖和高血脂,上调 p-AKT 等信号分子的表达水平,说明津力达可能通过 PI₃K/AKT 信号通路来改善胰岛素抵抗和脂代谢^[12]。研究发现天麦消渴片(天花粉、五味子、麦冬等)可以明显降低高脂饮食联合链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠的空腹血糖、口服糖耐量及胰岛素抵抗指数,上调 PI₃K、AKT2 和 p-AKT2 等基因和蛋白在大鼠肝脏的表达水平,说明可能通过调控 PI₃K/AKT 信号通路改善糖尿病大鼠的胰岛素抵抗^[13]。

PTEN(phosphate and tension homology deleted on chromosome ten)是一种脂质磷酸酶,是一种抑癌基因,是 PI₃K/AKT 通路的负调节因子。PTEN 磷酸化后功能失活,变成磷酸化 PTEN(p-PTEN),PTEN 基因失活、突变或者磷酸化水平低等可以增加肿瘤的易感性^[14]。PTEN 失活后,p-PTEN 增多,去磷酸化作用

丧失,激活 AKT 信号通路^[15]。

P70 核糖体蛋白 S6 激酶(p70 ribosomal protein S6 kinase,p70S6K)是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 mTOR 主要下游靶分子,高糖会造成 mTOR/p70S6K 过度激活,通过负反馈造成胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate 1,IRS1)的丝氨酸磷酸化增加影响胰岛素信号转导,从而引起胰岛素抵抗^[16]。有研究发现,db/db 小鼠肝脏 p70S6K 基因沉默后肝脏胰岛素抵抗得到改善,IRS1 磷酸化增加,AKT 蛋白表达不受影响,脂肪代谢也得到改善^[17]。

为了进一步研究清润方对胰岛素抵抗的作用机制,笔者用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测了 PI₃K/AKT/mTOR 信号相关基因的表达。发现和模型组比较,经过清润方大剂量组治疗后,糖尿病大鼠肝脏中 p-AKT 蛋白表达量增加,说明清润方可能是通过 PI₃K/AKT 信号通路改善的胰岛素抵抗。和模型组比较清润方大剂量组的 p-PTEN 蛋白表达增多,激活 AKT 信号通路,改善胰岛素抵抗。和模型组比较清润方大剂量组的 p-p70S6K 蛋白表达量降低,可以减少 mTOR/p70S6K 的过度激活从而改善胰岛素抵抗,改善脂类代谢。

综上所述,清润方可能通过 PI₃K/AKT/mTOR 信号通路改善了 2 型糖尿病大鼠的胰岛素抵抗和血脂代谢,具体的信号通路和转导机制还需要深入研究。

参考文献

- 1 Athyros VG, Doumas M, Imprialos KP, *et al.* Diabetes and lipid metabolism[J]. *Hormones (Athens)*, 2018, 17(1): 61-67
- 2 Zhang C, Yoon MS, Chen J. Amino acid-sensing mTOR signaling is involved in modulation of lipolysis by chronic insulin treatment in adipocytes[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296(4): E862-E868
- 3 Liu DD, Han CC, Wan HF, *et al.* Effects of inhibiting PI3K-Akt-mTOR pathway on lipid metabolism homeostasis in goose primary hepatocytes[J]. *Animal*, 2016, 10(8): 1319-1327
- 4 庞健丽. 2 型糖尿病三型辨证规范与疗效评价指标的研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2009
- 5 付莹坤,倪青,林兰. 清润方对糖尿病大鼠炎症反应及氧化应激的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(7): 202-205
- 6 Franks PW, McCarthy MI. Exposing the exposures responsible for type 2 diabetes and obesity[J]. *Science*, 2016, 354(6308): 69-73
- 7 Li J, Feng J, Wei H, *et al.* The Aqueous extract of gynura divaricata (L.) DC. improves glucose and lipid metabolism and ameliorates type 2 diabetes mellitus[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 8686297

(下转第 45 页)

有放射性的危害^[15,16]。因此,重组慢病毒载体在 FT293 细胞中的包装情况可实时的通过荧光显微镜观察,也为测定慢病毒滴度带来很大方便。另一方面,在重组病毒感染靶细胞时,也可直观观察目的基因感染组织细胞的效率。

本研究分别利用半定量 RT-PCR 及基因测序方法检测 pL/shRNA/F-shFAM172A,而后应用荧光显微镜和 QPCR 方法检测 FAM172A 在靶细胞中的表达水平。结果显示,FAM172A 干扰慢病毒感染的人 KTC-1 细胞中,FAM172A 表达被显著减少,说明本研究制备的人 FAM172A 干扰慢病毒构建成功且其转染效率较高。FAM172A 干扰慢病毒成功构建为深入全面研究 FAM172A 在人甲状腺乳头状癌发病中作用以及调控机制奠定了基础。

参考文献

- 1 李连喜,陶征,董雪红,等. C5orf21 基因的分子克隆及在糖尿病大血管病变中的作用[J]. 中华医学杂志,2009,89(36):2574-2577
- 2 李连喜,周闻白,陶征,等. FAM172A 蛋白对人胚胎肾细胞凋亡及增殖的影响[J]. 中华医学杂志,2010,90(34):2424-2427
- 3 Li L, Dong X, Leong MC, *et al.* Identification of the novel protein FAM172A, and its up-regulation by high glucose in human aortic smooth muscle cells[J]. *Int J Mol Med*,2010,26(4):483-490
- 4 Li MF, Zhang R, Guo MG, *et al.* FAM172A protein promotes the proliferation of human papillary thyroid carcinoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Mol Med Rep*,2016,13:353-358
- 5 李梅芳,张蓉,李连喜,等. 人 FAM172A 基因慢病毒载体的构建及其在巨噬细胞中的表达[J]. 医学研究杂志,2014,43(4):25-29
- 6 Buker SM, Iida T, Buhler M, *et al.* Two different argonaute comple-

xes are required for siRNA generation and heterochromatin assembly in fission yeast[J]. *Nat Struct Mol Biol*,2007,14(3):200-207

- 7 Cross NC. Histone modification defects in developmental disorders and cancer[J]. *Oncotarget*,2012,3(1):3-4
- 8 Cai L, Ma X, Huang Y, *et al.* Aberrant histone methylation and the effect of Suv39H1 siRNA on gastric carcinoma[J]. *Oncol Rep*,2014,31(6):2593-2600
- 9 Xia R, Zhou R, Tian Z, *et al.* High expression of H3K9me3 is a strong predictor of poor survival in patients with salivary adenoid cystic carcinoma[J]. *Arch Pathol Lab Med*,2013,137(12):1761-1769
- 10 Yokoyama Y, Hieda M, Nishioka Y, *et al.* Cancer-associated upregulation of histone H3 lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo[J]. *Cancer Sci*,2013,104(7):889-895
- 11 Kondo T, Nakazawa T, Ma D, *et al.* Epigenetic silencing of TTF-1/NKX2-1 through DNA hypermethylation and histone H3 modulation in thyroid carcinomas[J]. *Lab Invest*,2009,89(7):791-799
- 12 Naldini L, Blomer U, Gage FH, *et al.* Efficient transfer, integration, and sustained longterm expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1996,93(21):11382-11388
- 13 Lois C, Hong EJ, Pease S, *et al.* Germline transmission and tissue specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors[J]. *Science*,2002,295(5556):868-872
- 14 Dropulic B. Lentiviral vectors:their molecular design,safety,and use in laboratory and preclinical research[J]. *Hum Gene Ther*,2011,22(6):649-657
- 15 Stearns T. Green fluorescent protein. The green revolution[J]. *Curr Biol*,1995,5(3):262-264
- 16 Davis TN. Protein localization in proteomics[J]. *Curr Opin Chem Biol*,2004,8(1):49-53

(收稿日期:2018-03-12)

(修回日期:2018-03-31)

(上接第 40 页)

- 8 Wang Z, Liu Y, Li Q, *et al.* Preoperative oral carbohydrate improved postoperative insulin resistance in rats through the PI₃K/AKT/mTOR pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 9-17
- 9 Tang L, Liu CT, Wang XD, *et al.* A prepared anti-MSTN polyclonal antibody reverses insulin resistance of diet-induced obese rats via regulation of PI₃K/Akt/mTOR&FoxO1 signal pathways[J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(12): 2417-2423
- 10 Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657
- 11 Cusi K, Maezono K, Osman A, *et al.* Insulin resistance differentially affects the PI₃-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(3): 311-320
- 12 Liu Y, Song A, Zang S, *et al.* Jinlida reduces insulin resistance and ameliorates liver oxidative stress in high-fat fed rats[J]. *J Ethnopharmacol*,2015, 162: 244-252
- 13 Wang N, Li T, Han P. The effect of Tianmai Xiaoke Pian on insulin

resistance through PI₃-K/AKT signal pathway[J]. *J Diabetes Res*, 2016,2016:9261259

- 14 Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, *et al.* Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(14): 5010-5018
- 15 Tamura M, Gu J, Matsumoto K, *et al.* Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN[J]. *Science*, 1998, 280(5369): 1614-1617
- 16 Bouzakri K, Roques M, Gual P, *et al.* Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2003, 52(6): 1319-1325
- 17 李树颖. S6K1 在肝脏胰岛素抵抗及脂肪肝中作用机制的研究[D]. 天津:天津医科大学, 2009

(收稿日期:2018-07-12)

(修回日期:2018-07-31)