·基础研究·

白藜芦醇通过激活 PI3K/Akt 通路抑制高糖致肾小管上皮细胞凋亡的研究△

杨莎莎，周利*

湖北医药学院 附属太和医院 肾内科，湖北　十堰　442000

［摘要］ **目的**：白藜芦醇对高糖作用下肾小管上皮细胞（HK-2）氧化应激介导的凋亡影响及作用机制。**方法**：体外培养肾小管上皮细胞，高糖作用于肾小管上皮细胞诱导其凋亡，设置空白对照组、模型组（30 mmol·L^{-1}高糖处理）、不同浓度（5、10 μmol·L^{-1}）白藜芦醇组，LY294002（PI3K 抑制剂）组（10 μmol·L^{-1}）。使用 MTT 法检测各组细胞活力；流式细胞术检测各组细胞凋亡率；JC-1 检测线粒体膜电位（MMP）；DHE 荧光探针检测 ROS 的变化；特定试剂盒检测乳酸脱氢酶（LDH）、丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）、还原型谷胱甘肽（GSH-PX）含量；Western-blot 法检测各组细胞色素 C（CYT-C）、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（Caspase-3）蛋白表达水平以及 Akt 的磷酸化情况。**结果**：与空白对照组相比高糖损伤组能够显著降低肾小管上皮细胞的活力，增加细胞中 ROS 的含量和凋亡率，LDH（细胞外）、MDA 含量显著增加，SOD、GSH-PX 活性显著下降，同时降低线粒体膜电位，增加了 CYT-C、Caspase-3 的表达，而 p-Akt/Akt 表达降低（$P<0.01$）。不同浓度白藜芦醇（起效剂量 5 μmol·L^{-1}，高剂量 10 μmol·L^{-1}）和高糖同时作用肾小管上皮细胞时，细胞存活率逐渐上升，ROS 含量及凋亡率逐渐下降，LDH、MDA 含量逐渐下降，SOD、GSH-PX 活性随之上升，线粒体膜电位提升，CYT-C、Caspase-3 表达显著下降，p-Akt/Akt 表达增加（$P<0.01$）。LY294002（PI3K 抑制剂）组上述指标的检测结果与白藜芦醇组相反。**结论**：白藜芦醇可能部分通过激活 PI3K/Akt 通路抑制氧化应激及其诱导的凋亡，从而对肾小管上皮细胞发挥保护作用。

［关键词］ 白藜芦醇；肾小管上皮细胞；凋亡；PI3K/Akt；氧化应激

［中图分类号］ R285.5　　［文献标识码］ A　　［文章编号］ 1673-4890（2019）07-0913-07

doi：10.13313/j.issn.1673-4890.20181022005

Resveratrol Inhibits Oxidative Stress-mediated Apoptosis in Renal Tubular Epithelial Cells by Activating PI3K/Akt Pathway

YANG Sha-sha，ZHOU Li*

Department of Nephrology，Taihe Hospital Affiliated to Hubei Medical College，Shiyan 442000，*China*

［**Abstract**］ **Objective**：To investigate the effect of resveratrol on oxidative stress-mediated apoptosis in renal tubular epithelial cells（HK-2）under high glucose action and its mechanism of action. **Methods**：HK-2 was cultured *in vitro*. High glucose acted on HK-2 to induce apoptosis mediated by oxidative stress. The cell viability of each group was detected by MTT assay. The apoptosis rate of cells in each group was detected by flow cytometry. The MMP of each group was detected by JC-1. The ROS of each group was detected by DHE. The LDH，MDA，SOD and GSH-PX of each group was detected by specific kit. Western blot was used to detect the expression of protein（CYT-C，Caspase-3 and p-Akt/Akt）in each group. **Results**：Resveratrol significantly enhanced HK-2 viability and increased the activities of antioxidant enzymes（superoxide dismutase，catalase），scavenged reactive oxygen species（ROS），raised MMP. Resveratrol also reduced the rate of apoptosis of cells. Resveratrol downregulated oxidative stress（CYT-C）and its mediated apoptosis pathway related protein（Caspase-3）expression. Resveratrol also activated phosphorylation of Akt，whereas the addition of LY294002，a pharmacological inhibitor of PI3K，blocked resveratrol-induced downregulation of protein（CYT-C，Caspase-3）expression and cytoprotection. **Conclusion**：Resveratrol can prevent apoptosis of HK-2 through inhibiting apoptosis mediated by oxidative stress，which may protect vascular

△［基金项目］ 湖北省教育厅科学基金（B2013117）

*［通信作者］ 周利，主管护师，研究方向：中药有效成分对肾功能的改善；E-mail：984428145@qq.com

endothelial cells and cardiovascular system. The main mechanism responsible for the inhibition of oxidative stress is the activation of the PI3K-Akt pathway.

［**Keywords**］　resveratrol；HK-2；apoptosis；PI3K/Akt；oxidative stress

糖尿病肾病(DN)的特征在于肾炎、尿白蛋白、肾小球滤过率降低、肾小球硬化症和肾间质纤维化，是终末期肾病(ESRD)的主要原因。因此，探索介导 DN 的机制对于缓解 DN 的预防和治疗策略至关重要[1]。白藜芦醇(RSV)是一种天然多酚化合物，存在于各种水果中，如葡萄、坚果、浆果以及红葡萄酒。以前的研究表明，RSV 具有多种有益的健康效果，包括抗氧化、抗炎、抗癌、心脏保护和神经保护活动。关于糖尿病肾病，以前的报道表明 RSV 可以改善肾功能不全和病理改变，以及通过体内糖尿病条件下的多种信号通路阻止高葡萄糖诱导的肾小球系膜细胞增殖和肾小球纤维连接蛋白的表达[2]。现已有研究报道指出，白藜芦醇对高糖诱导肾小管上皮细胞凋亡具有保护作用，从而对糖尿病肾病起保护作用[3-4]。

糖尿病患者的死亡率很高。由高血糖引起的线粒体功能障碍有助于 DN 发生发展，其原理可能与活性氧(ROS)过度产生和腺苷三磷酸(ATP)产生的降低有关，尤其是在肾小管上皮细胞。近端肾小管主要作用水的重吸收、葡萄糖及电解质(钠离子)运输，这些都需要大量的 ATP。而 ATP 主要来源于细胞内的线粒体。当细胞受到损害(氧化应激)，线粒体功能障碍导致 ATP 产出减少。因此，肾氧化应激是 DN 重要的发病机制之一，抑制肾氧化应激可有效地治疗 DN，这为其治疗提供了新切入点[5]。

磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸 3-激酶(PI3K)蛋白激酶 B(Akt)途径即 PI3K/Akt，是调节细胞增殖、分化、凋亡、衰老、抗氧化的关键信号通路[6]。研究表明，PI3K/Akt 通路对氧化应激及其引起的凋亡起着重要的保护作用[7]。大量研究报道指出，白藜芦醇具有抗氧化应激的作用[8]。基于上述报道，本研究采用高糖诱导肾小管上皮细胞损伤作为模型，探讨白藜芦醇是否通过激活 PI3K/Akt 通路抑制高糖诱导的氧化应激，从而对肾小管上皮细胞发挥保护作用。

1　材料与仪器

1.1 材料

白藜芦醇(南京景竹生物科技有限公司，批号：JS190524，纯度：99%)。肾小管上皮细胞(HK-2，南京凯基生物科技发展有限公司)。

胎牛血清(美国 Earthox 公司)、胰酶和 DMEM 培养基(上海翊圣生物科技公司)；MTT 试剂盒(沈阳万类生物科技公司)；乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒购自南京建成生物公司；JC-1(线粒体膜电位)试剂盒购自 AAT Bioquest；膜联蛋白 V/碘化丙啶(Annexin-V/PI)细胞凋亡检测试剂盒(沈阳万类生物科技公司)；二氢乙锭(DHE，美国 AAT Bioquest 公司)；抗体磷酸化 Akt(p-Akt)、Akt、细胞色素 C(CYT-C)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)购自沈阳万类生物科技公司；LY294002(美国 APExBIO 公司)。

1.2 仪器

立式压力蒸气灭菌器(上海三中医疗器械有限公司)，干燥箱(上海福玛实验有限公司)，超净工作台(苏净集团有限公司)，二氧化碳孵箱(美国 Thermo Fisher 公司)，荧光显微镜(德国 Leica 公司)，高速台式大容量离心机(德国 HERMLE 公司)，多头磁力搅拌器(江苏中大仪器厂)，超声波破碎机(美国 SONICS 公司)，制冰机(日本大阪松下电器产业株式会社)，优普超纯水制造系统(新加坡优普公司)，流式细胞仪(美国 BD FACSCelesta™公司)。

2　方法

2.1 细胞培养及分组

肾小管上皮细胞培养在 DMEM 培养基，在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养，待细胞达到 90% 左右的融合度时，取对数生长期细胞用于实验。实验分组(平行孔数 $n = 5$)：空白对照组；模型组(培养基中加入 30 mmol·L^{-1}高糖孵育 8 h)；白藜芦醇低、高浓度组(培养基中分别先加入 5、10 μmol·L^{-1}白藜芦醇孵育 4 h，再加入 30 mmol·L^{-1}高糖孵育 8 h)；PI3K 抑制剂组(10 μmol·L^{-1}白藜芦醇和 10 μmol·L^{-1}PI3K 抑制剂 LY294002 共同处理 4 h，再加入 30 mmol·L^{-1}高糖孵育 8 h)。

2.2 MTT 法检测细胞活力

将细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔培养板中。

按本实验设计的分组及给药方法培养后，去上清液，每孔加入新鲜培养液 90 μL、MTT 10 μL(5 g·L^{-1})，培养 4 h；然后弃上清液，每孔加入 100 μL DMSO，摇床中振摇 15 min 后，在酶标仪 492 nm 波长处测定吸光度值。根据每组细胞的吸光度(A)值计算细胞活力。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡变化

按实验设计处理各细胞组后，消化、离心、收集细胞。用 PBS 洗涤 2 次，调整细胞密度为 5 × 10^{5}个/L。按照 Annexin-V/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明，在每组细胞中加入 5 μL 的 Annexin-V 及 10 μL 的 PI，反应 15 min，加入 300 μL 缓冲液，1 h 内用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。Q1：坏死细胞比例；Q2：晚期细胞凋亡比例；Q3：正常细胞比例；Q4：早期细胞凋亡比例。其中总凋亡率 = Q2 + Q4。

2.4 DHE 荧光探针检测肾小管上皮细胞中 ROS 的变化

根据文献中的方法[9]，将肾小管上皮细胞以 1 × 10^{5}个/孔密度接种于 6 孔板中。分组、给药同上，24 h 后弃去上清液，PBS 洗 3 次，加入 10 μmol·L^{-1} 的 DHE，37 ℃孵育 30 min，在荧光显微镜下观察、拍照。使用 Imge-pro plus 6 软件分析，结果以荧光强度表示。

2.5 JC-1 检测线粒体跨膜电位(MMP)

将肾小管上皮细胞接种到 24 孔细胞培养板中。实验分 5 组：空白对照组、模型组、白藜芦醇组(浓度为 5、10 μmol·L^{-1})、PI3K 抑制剂组。细胞培养和处理方法同 **2.1**，培养结束后，加入 1 mL 的 JC-1 染色工作液(5 mg·L^{-1})，在细胞培养箱中于 37 ℃温育 20 min，然后用 JC-1 染色缓冲液洗涤两次，同时加入细胞培养液。利用倒置荧光显微镜观察荧光，测量红色和绿色荧光强度以了解细胞线粒体膜电位(ΔΨM)的变化。正常线粒体显示红色荧光，当 ΔΨM 降低时，显示绿色荧光。使用 Imge-pro plus 6.0 软件分析。聚集体和单体 JC-1 的比例用于量化线粒体膜电位的变化。

2.6 肾小管上皮细胞抗氧化指标测定

收集各组细胞上清液，按照试剂盒说明书检测 LDH、MDA、SOD、GSH-PX 含量变化。

2.7 免疫印迹法(Western-blot)测定蛋白表达

按实验设计处理细胞后，弃去上清液，收集各组细胞置于裂解液(RIPA + 1 mmol·L^{-1} PMSF)中(4 ℃)。各组的样本蛋白浓度通过 BCA 蛋白定量测定肾小管上皮细胞中的蛋白浓度。添加 5 × 的上样缓冲液，在沸水中放置 4 min。40 μg 蛋白在 8% ~12% SDS-PAGE 中，85 V 的条件下 2 h，然后通过半干转转膜 15 V、20 min，转至 PVDF 膜上。PVDF 膜在 1% BSA 中室温封闭 2 h。添加一抗 p-Akt、Akt、CYT-C、Caspase-3 一抗(1∶1000)，4 ℃过夜。TBST 清洗 3 次，每次 5 min。PVDF 膜在室温下孵育二抗 2 h。TBST 清洗 3 次，每次 5 min。通过 ECL 显影液进行显影。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 对数据进行统计分析，数据用($\bar{x} \pm s$)表示。在方差齐性条件下采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$、$P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1 白藜芦醇对高糖作用后肾小管上皮细胞活力的影响

MTT 检测发现，与空白对照组相比，高糖损伤组活力显著降低($P < 0.01$)，而白藜芦醇组细胞活力明显上升($P < 0.01$)。LY294002 组结果与白藜芦醇高浓度组相反($P < 0.01$)。实验结果说明白藜芦醇可以增强肾小管上皮细胞的活力，而 LY294002 能阻止这种效果(见表 1)。

表 1　白藜芦醇对细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$，$n = 5$)

分组	剂量/μmol·L^{-1}	细胞活力/%
空白对照组		97.5 ± 5.7 **
高糖损伤组(模型组)	30	50.2 ± 3.0
白藜芦醇低浓度组	5	61.4 ± 3.6 *
白藜芦醇高浓度组	10	86.9 ± 5.1 **
PI3K 抑制剂组	10 + 10	52.3 ± 3.2 ##

注：与模型组比较，* $P < 0.05$，** $P < 0.01$；与白藜芦醇高浓度组比较，## $P < 0.01$，下同。

3.2 白藜芦醇对高糖作用后肾小管上皮细胞凋亡的影响

流式细胞术检测发现，高糖损伤组细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$，与对照组比较)；而不同浓度的白藜芦醇组细胞凋亡率显著下降($P < 0.01$)；PI3K 抑制剂组结果与白藜芦醇高浓度组相反($P < 0.01$)；说明白藜芦醇能减少高糖作用后肾小管上皮细胞的凋亡率，而 LY294002 能阻止这种效果(见图 1、表 2)。

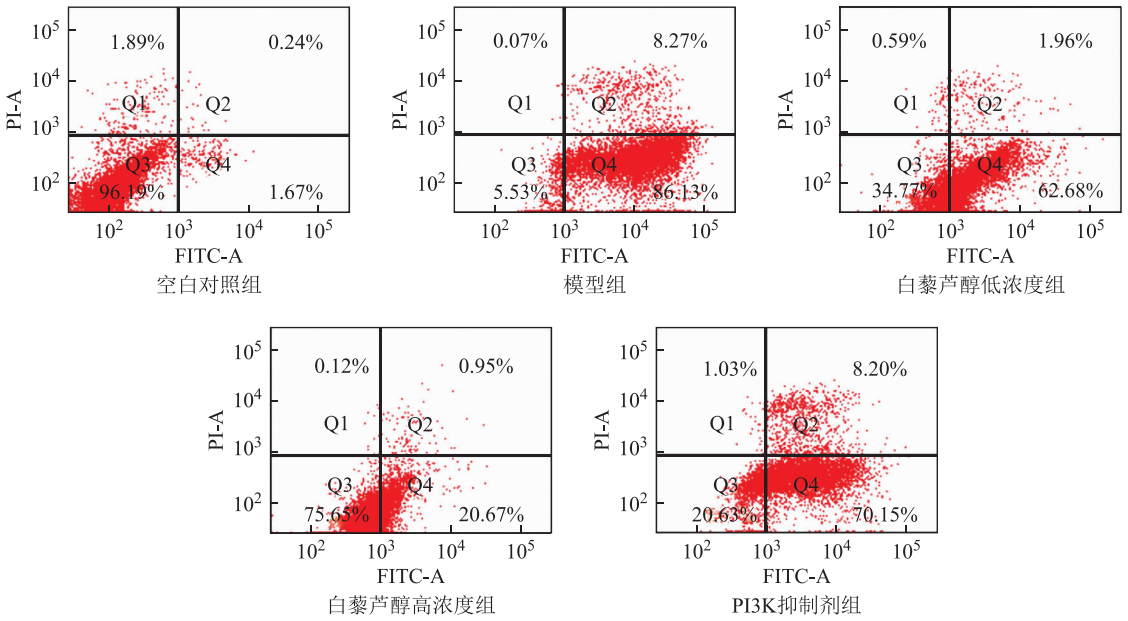


图 1　白藜芦醇对高糖作用后肾小管上皮细胞凋亡率的影响

表 2　白藜芦醇对细胞凋亡率的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

分组	剂量/μmol·L^{-1}	细胞凋亡率%
空白对照组		3.2 ± 1.1 **
高糖损伤组（模型组）	30	90.3 ± 6.7
白藜芦醇低浓度组	5	67.1 ± 4.9 *
白藜芦醇高浓度组	10	22.4 ± 3.5 **
PI3K 抑制剂组	10 + 10	85.6 ± 5.2 ##

3.3 白藜芦醇对高糖作用后肾小管上皮细胞 ROS 的影响

DHE 荧光探针检测显示，高糖损伤组肾小管上皮细胞 ROS 显著升高（$P < 0.01$），而白藜芦醇组 ROS 含量则明显降低（$P < 0.01$），PI3K 抑制剂组结果与白藜芦醇高浓度组相反（$P < 0.01$）。实验表明，白藜芦醇可以在高糖作用后减少肾小管上皮细胞中 ROS 的产生，而 LY294002 可以阻止这种作用（见图 2，表 3）。

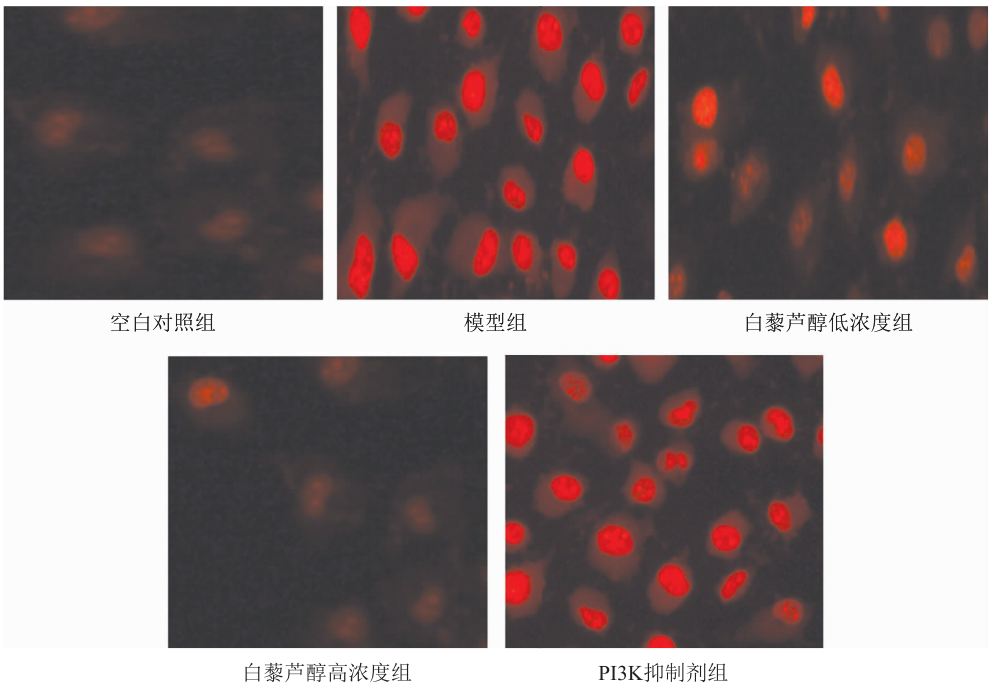


图 2　白藜芦醇对高糖作用后肾小管上皮细胞的 ROS 影响

表 3　白藜芦醇对细胞 ROS 的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

分组	剂量/μmol·L^{-1}	ROS（MFI 平均荧光强度）
空白对照组		52.3 ± 7.2 **
高糖损伤组（模型组）	30	263.2 ± 23.5
白藜芦醇低浓度组	5	198.4 ± 20.9 *
白藜芦醇高浓度组	10	95.1 ± 13.4 **
PI3K 抑制剂组	10 + 10	256.7 ± 17.2 ##

3.4 白藜芦醇对高糖作用后肾小管上皮细胞线粒体膜电位（MMP）的影响

JC-1 检测白藜芦醇对高糖作用后肾小管上皮细胞线粒体膜电位的变化检测发现，与对照组相比，模型组（高糖损伤组）肾小管上皮细胞线粒体膜电位显著下降（$P < 0.01$）；而不同浓度白藜芦醇组细胞线粒体膜电位随浓度梯度逐渐上升（$P < 0.01$）；PI3K 抑制剂组与白藜芦醇组结果相反（$P < 0.01$）（见图 3、表 4）。

表 4　白藜芦醇对肾小管上皮细胞膜电位（MMP）的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

分组	剂量/μmol·L^{-1}	Red/Green
空白对照组		6.2 **
高糖损伤组（模型组）	30	0.8 ± 0.1
白藜芦醇低浓度组	5	2.8 ± 0.6 *
白藜芦醇高浓度组	10	5.3 ± 1.3 **
PI3K 抑制剂组	10 + 10	0.9 ± 0.2 ##

3.5 白藜芦醇对高糖作用后肾小管上皮细胞 LDH、MDA、SOD 和 GSH-PX 的影响

经检测发现，高糖损伤组 LDH、MDA 含量显著增加，SOD、GSH-PX 活性显著下降（与对照组相比，$P < 0.01$）；白藜芦醇具有改善细胞抗氧化能力，各组 LDH、MDA 含量逐渐下降，SOD、GSH-PX 活性逐渐上升（$P < 0.01$）。PI3K 抑制剂组结果与高浓度白藜芦醇组相反（$P < 0.01$）（见表 5）。

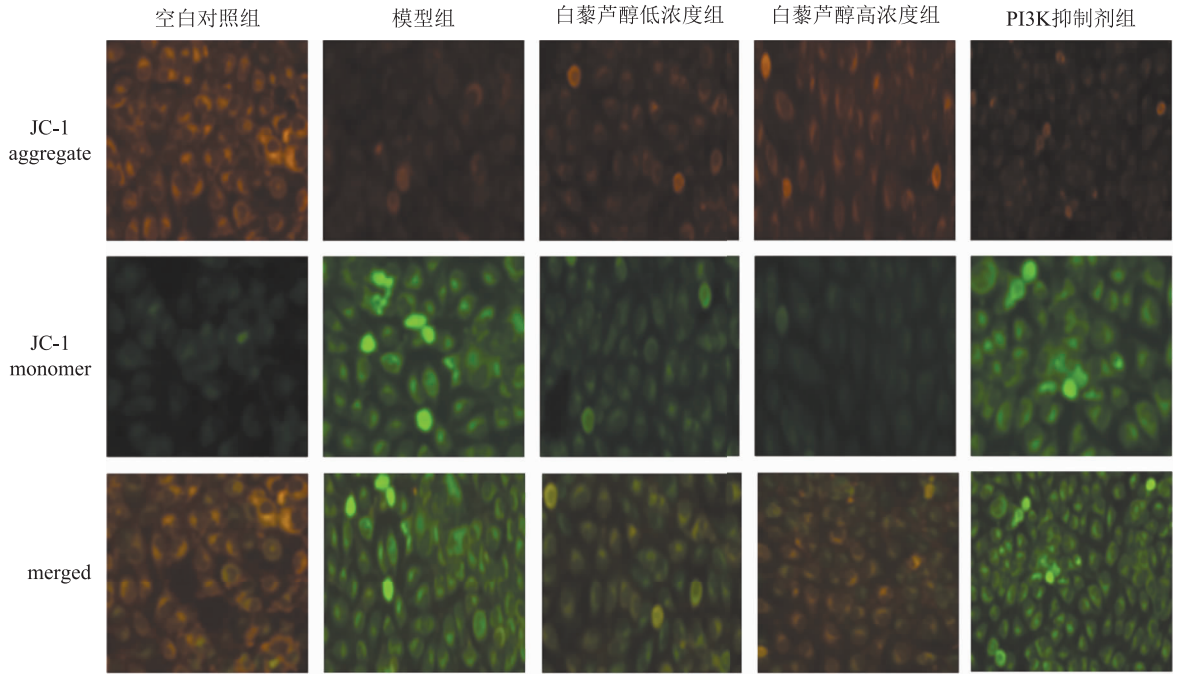


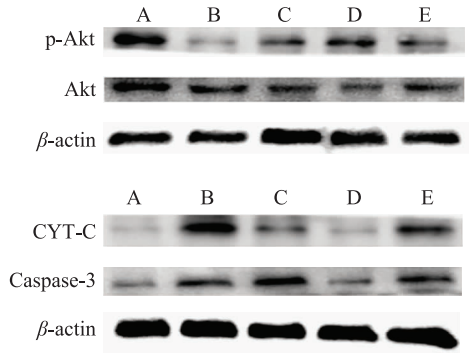
图 3　白藜芦醇对高糖作用后肾小管上皮细胞线粒体膜电位的影响

表 5　白藜芦醇对细胞 LDH、MDA、SOD 和 GSH-PX 的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

分组	剂量/μmol·L^{-1}	LDH/U·L^{-1}	MDA/nmol·mg^{-1}	SOD/U·mg^{-1}	GSH-PX/U·mg^{-1}
空白对照组		252.8 ± 44.7 **	2.13 ± 0.23 **	38.1 ± 2.2 **	146.1 ± 16.3 **
高糖损伤组（模型组）	30	974.5 ± 129.1	4.49 ± 0.28	14.3 ± 1.4	62.5 ± 12.9
白藜芦醇低浓度组	5	727.6 ± 164.4 *	3.65 ± 0.34 *	22.7 ± 3.5 *	85.4 ± 13.4 *
白藜芦醇高浓度组	10	478.2 ± 175.8 **	2.66 ± 0.17 **	34.5 ± 4.1 **	116.7 ± 18.2 **
PI3K 抑制剂组	10 + 10	955.3 ± 156.9 ##	4.37 ± 0.25 ##	15.2 ± 1.7 ##	61.2 ± 10.7 ##

3.6 白藜芦醇对高糖作用后肾小管上皮细胞 CYT-C、Caspase-3、p-Akt/Akt 蛋白表达的影响

Western-blot 分析显示，模型组肾小管上皮细胞中 p-Akt/Akt 的表达显著低于空白对照组（$P < 0.01$）。白藜芦醇恢复了细胞 p-Akt/Akt 的表达（$P < 0.01$），抑制剂发挥效应，阻止这种作用。模型组中 CYT-C、Caspase-3 的表达升高，白藜芦醇可以降低 CYT-C、Caspase-3 的表达（$P < 0.01$），PI3K 抑制剂组结果与之相反。提示白藜芦醇可能通过上调 p-Akt/Akt 的表达来降低 CYT-C、Caspase-3 的表达，而 LY294002 可以阻止这种作用。因此，白藜芦醇抑制氧化应激及其诱导凋亡的机制与 PI3K/Akt 通路密切相关（见图 4、表 6）。



注：A. 空白对照组；B. 模型组；C. 白藜芦醇低浓度组；D. 白藜芦醇高浓度组；E. PI3K 抑制剂组。

图 4　白藜芦醇对高糖作用后肾小管上皮细胞中 CYT-C、Caspase-3、p-Akt/Akt 蛋白表达的影响

4　讨论

糖尿病已成为全球主要的公共卫生问题之一。在中国，糖尿病在成年人中的患病率达到了 10.9%。DN 是糖尿病的常见慢性微血管并发症，也是终末期肾病的重要原因。同时，糖尿病患者大约 40% 有 DN。肾小球结构肥大、肾小球基底膜增厚、系膜细胞增生、肾小管间质扩张以及细胞外基质（ECM）成分（如胶原和纤维连接蛋白）的异常积聚是 DN 的主要病理特征。胶原纤维的增加是肾纤维化的主要特征。在此过程中，肾脏经历过多的胶原沉积，导致肾实质逐渐硬化和瘢痕形成，最终导致肾功能完全丧失[10]。本研究在体外培养大鼠肾小管上皮细胞，发现用高糖刺激能明显增加肾小管上皮细胞的凋亡。氧化应激被认为是糖尿病肾病共同的发病途径[11]。

糖尿病肾病的发生发展中，活性氧扮演着重要角色[12]。有报道指出，氧化应激引起的肾小管上皮细胞凋亡，活性氧在其中发挥关键作用[13]。在高糖环境下 ROS 产生过多，会导致核酸断裂、酶失活、多糖解聚、脂质过氧化和许多其他破坏性过程，最终会导致细胞凋亡。本实验中，白藜芦醇降低了高糖作用后肾小管上皮细胞 ROS 含量。LDH、MDA、SOD、GSH-PX 代表着细胞的氧化应激的水平。本实验中，模型组 LDH 和 MDA 升高，而不同浓度的白藜芦醇组 LDH 和 MDA 含量逐渐下降，证明白藜芦醇可以减少细胞氧化应激。

PI3K/Akt 途径是细胞周期过程中非常重要的细胞内信号传导途径。它与细胞静止、增殖、癌症和长寿等有关[14]。PI3K 活化磷酸化并进一步激活 Akt，Akt 定位于细胞膜。活化的 Akt 具有多种生物学功能，包括激活 cAMP 反应元件结合蛋白，抑制 p27，在细胞质中定位叉头盒蛋白 O（FOXO），激活磷脂酰肌醇 3-磷酸（PtdIns3ps 或 PI3P）和激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mTOR）。已经确定 PI3K/Akt 途径可以通过几种生物分子增强，包括表皮生长因子（EGF）、胰岛素样生长因子（IGF）-1 和胰岛素钙调蛋白。相反，该途径被其他分子拮抗，包括 PTEN、糖原合成酶激酶 3β 和转录因子 HB9。PI3Ks 是脂质激酶家族，通过磷脂酰肌醇（PI）的特异性催化 3-羟基磷酸化产生第二信使[15]。PI3K/Akt 信号途径的磷酸化作用生成 p-Akt 而被激活，抵抗细胞的氧化应激损伤[16]。在我们的研究中，白藜芦醇激活 PI3K/Akt 通路，这是抑制氧化应激及其介导的细胞凋亡的潜在机制。

表 6　白藜芦醇对细胞 CYT-C、Caspase-3、p-Akt/Akt 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

分组	剂量/μmol·L^{-1}	p-Akt/Akt	CYT-C/β-actin	Caspase-3/β-actin
空白对照组		1.19 ± 0.21 **	0.26 ± 0.12 **	0.35 ± 0.12 **
高糖损伤组（模型组）	30	0.23 ± 0.10	1.16 ± 0.17	1.29 ± 0.21
白藜芦醇低浓度组	5	0.49 ± 0.16 *	0.73 ± 0.13 *	0.82 ± 0.15 *
白藜芦醇高浓度组	10	1.02 ± 0.18 **	0.41 ± 0.11 **	0.47 ± 0.13 **
PI3K 抑制剂组	10 + 10	0.25 ± 0.09 ##	0.99 ± 0.14 ##	1.26 ± 0.17 ##

综上所述，白藜芦醇部分可能通过激活 PI3K/Akt 通路抑制了高糖介导的肾小管上皮细胞氧化损伤及凋亡。

参考文献

[1] THAKUR S,VISWANADHAPALLI S,KOPP J B,et al. Activation of AMP-activated protein kinase prevents TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition and myofibroblast activation[J]. Am J Pathol,2015,185(8):2168-2180.

[2] 吴海江,邓新娜,史永红,等. 白藜芦醇对高糖刺激下人肾小管上皮细胞发生 EMT 的作用[J]. 中国细胞生物学学报,2015,37(11):1522-1527.

[3] 宋碧辉,谢红萍. 白藜芦醇对高糖诱导肾小管上皮细胞凋亡的保护作用及机制[J]. 中国老年学,2016,36(19):4686-4689.

[4] 游娜,王雅云,董成龙,等. 白藜芦醇对高糖状态下大鼠肾小管上皮细胞增殖、凋亡的影响及机制[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2015,13(4):485-489.

[5] 张苏皖,李素梅. 糖尿病肾病与线粒体氧化应激[J]. 临床与病理杂志,2011,31(6):535-538.

[6] 崔伟,王高频,王洪新,等. 黄芪甲苷通过激活 PI3K/Akt 通路抑制内皮细胞内质网应激介导的细胞凋亡的研究[J]. 中药药理与临床,2018,34(5):39-44.

[7] KANG K A,WANG Z H,ZHANG R,et al. Myricetin Protects Cells against Oxidative Stress-Induced Apoptosis via Regulation of PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways[J]. International Journal of Molecular Sciences,2010,11(11):4348-4360.

[8] LI Q,YUE Y F,CHEN L,et al. Resveratrol Sensitizes Carfilzomib-Induced Apoptosis via Promoting Oxidative Stress in Multiple Myeloma Cells[J]. Front Pharmacol,2018,9(24):334.

[9] WANG R,MOYUNG K C,ZHAO Y J,et al. A Mechanism for the Temporal Potentiation of Genipin to the Cytotoxicity of Cisplatin in Colon Cancer Cells[J]. Int J Med Sci,2016,13(7):507-516.

[10] THILO F,LEE M,XIA S,et al. High glucose modifies transient receptor potential canonical type 6 channels via increased oxidative stress and syndecan-4 in humanpodocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun,2014,450(1):312-317.

[11] JHA J C,GRAY S P,BARIT D,et al. Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol,2014,25(6):1237-1254.

[12] HUNJOO H A,HIBAHL L E. Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose[J]. Kidney Int Suppl,2000,77:S19-S25.

[13] GU D M,CHEN Y,ZHANG X B,et al. Effect of ketamine on oxidative stress in Lipopolysaccharide-stimulated rat alveolar macrophage cell line[J]. J Clin Med Pract,2008,12(13):1-7.

[14] SHAW R J,CANTLEY L C. Ras,PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth[J]. Nature,2006,441(70):424-430.

[15] ALESSANDRA G, MINGCHUAN L. Phosphoinositide 3-kinase:friend and foe in cardiovascular disease[J]. Front Pharmacol,2015,6(13):16-19.

[16] 刘亭,李月婷,李勇军. 荭草花醇提物对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用机制研究[J]. 天然产物研究与开发,2018,14(2):23-26.

（收稿日期：2018-10-22　　编辑：王丽英）

（上接第 854 页）

[33] CHUMARK P,KHUNAWAT P,SANVARINDA Y,et al. The *in vitro*, and *ex vivo*, antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves[J]. J Ethnopharmacol,2008,116(3):439-446.

[34] DINKOVA-KOSTOVA A T,KOSTOV R V. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease[J]. Trends Mol Med,2012,18(6):337-347.

[35] MOHAN M,KAUL N,PUNEKAR A,et al. Nootropic activity of *Moringa oleifera* leaves[J]. J Nat Remedies,2005,5(1):59-62.

[36] GONZÁLEZ-TRUJANO M E, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ C L,Flores-Carrillo M,et al. Behavioral and electroencephalographic evaluation of the anticonvulsive activity of *Moringa oleifera* leaf non-polar extracts and one metabolite in PTZ-induced seizures[J]. Phytomed Int J Phytother Phytopharmacol,2018,39(15):1-9.

[37] ASHRAF M. Moringa oleifera:a food plant with multiple medicinal uses.[J]. Phytother Res,2007,21(1):17-25.

[38] IGADO O O,OLOPADE J K. A review on the possible neuroprotective effects of *Moringa Oleifera* leaf extract[J]. Niger J Physiol Sci,2017,31(2):183-187.

[39] 陈艳,张梅,王金萍,等. 辣木叶和种子的提取及急性毒性评价[J]. 药学实践杂志,2017,35(4):334-336.

（收稿日期：2018-04-18　　编辑：戴玮）