

网络出版时间: 2020-9-24 10:27 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200923.1150.011.html>

不同浓度葡萄糖对红细胞能量代谢的影响

李旭妍¹, 孙明玥¹, 苏燕¹, 杨丽丽¹, 王亚奇¹, 宋芳¹, 闫巧梅¹, 黄世琪¹,
闫朝丽², 萨如拉², 李晶晶², 梁浩³, 王云霞³, 韩家鑫³, 聂欣雨³, 刘瑞刚⁴

摘要 目的 探讨体外不同浓度葡萄糖对红细胞能量代谢的影响及其分子机制。方法 采集6例健康成人新鲜抗凝血,离心去除白细胞和血浆,用PBS重悬洗涤红细胞3次后,将6组红细胞轻轻混匀后再分为4组,分别向其中加入D-葡萄糖溶液,使其终浓度分别为0、6、20、30 mmol/L,于37℃培养0、24、48 h后,取部分红细胞悬液利用流式细胞仪及多功能酶标仪检测红细胞内ATP含量、己糖激酶(HK)活性、丙酮酸激酶(PK)活性、活性氧(ROS)含量及红细胞死亡率。实验结果采用单因素方差分析进行组间变量比较。结果 与对应时间点的0 mmol/L组比较,用浓度为6、20、30 mmol/L的葡萄糖孵育红细胞24和48 h后,红细胞内HK活性、PK活性、ATP含量均增加,且随着葡萄糖浓度增加呈上升趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$);而ROS含量和红细胞死亡率是降低的,且随葡萄糖浓度增加而降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。用不同浓度葡萄糖(浓度分别为0、6、20、30 mmol/L)培养红细胞48 h后,各不同浓度组红细胞内ROS含量和红细胞死亡率随着孵育时间延长而增加,与对应浓度组的0 h比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);HK活性和PK活性逐渐降低,与对应浓度组的0 h比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而ATP含量呈波动式下降,与对应浓度组的0 h比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 红细胞体外短期高糖培养,不仅会加强红细胞内能量代谢,而且会降低氧化应激及死亡发生率,而没有葡萄糖供应会导致红细胞

内ATP不断被消耗,氧化应激增强,死亡增多。

关键词 红细胞;葡萄糖;能量代谢;死亡

中图分类号 R 589.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)11-1701-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.011

糖尿病是一类由于胰岛素分泌缺陷或胰岛素作用障碍所致的以慢性高血糖为特征的终身代谢性疾病,已成为继癌症和心血管病之后的又一严重威胁人类健康的全球性疾病^[1-3]。它的诱发因素很多,目前公认的有遗传、环境、生活方式及个人体质等。红细胞随血液循环于全身,是最早感知血糖变化的细胞之一。近年,主要从血红蛋白糖基化^[4]、红细胞分布宽度^[5]、红细胞膜^[6]等方面针对糖尿病患者的红细胞改变进行了较为深入的研究,而从红细胞能量代谢方面探索其在糖尿病及其微血管病变发生发展中作用的研究少之又少。该研究拟通过实时检测不同浓度葡萄糖37℃培养红细胞不同时间后,其ATP含量、己糖激酶(hexokinase, HK)活性、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)活性、活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量及红细胞死亡率的变化,阐明葡萄糖对体外红细胞能量代谢的影响方式及其分子机制,为糖尿病微血管病变的诊断和防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 正常成人新鲜抗凝血、ATP检测试剂盒(货号S0027)、ROS检测试剂盒(货号S0033)购自上海碧云天生物技术公司;Hexokinase Activity Assay试剂盒(货号ab136957)、Pyruvate Activity Assay试剂盒(货号ab83432)购自英国Abcam公司;APC Annexin V细胞凋亡检测试剂盒(货号550474)购自美国BD公司;葡萄糖(货号D810588)、PBS缓冲液(货号P854529-40EA)购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 血样采集与红细胞制备 该项目由包头医

2020-05-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81860029);内蒙古自然科学基金(编号:2016MS0801);内蒙古自治区卫生和计划生育委员会科研计划项目(编号:201701090);内蒙古自治区研究生科研创新资助项目(编号:S2018112036Z);包头医学院“花蕾计划”项目(编号:2018BYJJ-HL-05、2018BYJJ-HL-25)

作者单位: 包头医学院¹ 生物化学与分子生物学教研室、³ 临床学院, 包头 014000

² 内蒙古医科大学第一附属医院内分泌科, 呼和浩特 010000

⁴ 包头医学院第一附属医院检验科, 包头 014000

作者简介: 李旭妍,女,硕士研究生;

苏燕,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: synmg@126.com;

闫朝丽,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: aliceyz@126.com

学院伦理委员会审核批准,依据实验要求每批实验招募 18~23 岁的健康志愿献血者 6 例,并在献血前与志愿者签署知情同意书。分别采集 5 ml 全血,2 000 r/min 离心 5 min 后,去除血小板、白细胞和血浆。再用 PBS 清洗红细胞,2 000 r/min 离心 5 min,去除上清液及中间的血小板和白细胞,重复洗至上清液透明。然后于无菌操作台中将红细胞重悬于 PBS,使红细胞压积达到 45% 左右。将制备好的悬浮红细胞轻轻混匀后分为 4 组(每组 1 ml,重复 3 次),分别向其中加入 D-葡萄糖,使其终浓度分别为 0、6、20、30 mmol/L。轻轻混匀,37 °C 震荡水浴培养 48 h。分别于培养期 24 和 48 h,轻轻混匀 EP 管中的悬液,无菌抽取 200 μ l 红细胞悬液,分别进行以下指标检测。

1.2.2 ATP 含量检测 取红细胞悬液 60 μ l,2 000 r/min,离心 5 min,弃上清液。轻轻弹散红细胞,取 5 μ l 红细胞加入到 200 μ l Buffer 中制成溶血液。取 4 μ l 溶血液加入到 100 μ l 检测液及 16 μ l 裂解液中,利用多功能酶标仪的 luminometer 功能测定各孔的相对光单位(relative luminometer units,RLU) 值并计算结果。

1.2.3 HK 活性检测 取红细胞悬液 60 μ l,2 000 r/min,离心 5 min,弃上清液。轻轻弹散红细胞,取 10 μ l 制成溶血液,再取 20 μ l 溶血液加入到 80 μ l 检测液,室温避光放置 20 min 后,利用多功能酶标仪检测 450 nm 波长处各孔的光密度(optical density,OD) 值并计算结果。

1.2.4 PK 活性检测 取红细胞悬液 40 μ l,2 000 r/min,离心 5 min,弃上清液。轻轻弹散红细胞,取 10 μ l 制成溶血液,再取 2 μ l 溶血液加入到 98 μ l 检测液中,室温避光放置 10 min 后,利用多功能酶标仪检测 570 nm 波长处各孔的 OD 值并计算结果。

1.2.5 ROS 检测 取红细胞悬液 20 μ l,2 000 r/min,离心 5 min,弃上清液。轻轻弹散红细胞,取 1 μ l 红细胞加入到按照 1:1 000 用 PBS 缓冲液稀释的 DCFH-DA(500 μ l) 中,室温避光孵育 30 min,然后 3 500 r/min,离心 5 min,弃上清液。加 500 μ l PBS 缓冲液洗红细胞,重复 3 次,加入 300 μ l PBS 缓冲液重悬红细胞后,利用流式细胞仪检测 ROS 含量。

1.2.6 红细胞衰亡检测 取红细胞悬液 20 μ l,2 000 r/min,离心 5 min,弃上清液。轻轻弹散红细胞,取 1 μ l 红细胞加入到 100 μ l 工作液中(100 μ l 的 1 $\times$ Binding buffer 与 0.5 μ l Annexin V-FITC 和

APC 的混合液),轻轻混匀,室温避光孵育 15 min 后用流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计分析。所测数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度葡萄糖对红细胞内 ATP 含量的影响

在不同浓度葡萄糖组,随着培养时间的延长,各不同浓度葡萄糖组红细胞内 ATP 含量呈波动式下降,其中 0 mmol/L 组红细胞内 ATP 含量下降最为显著,6 mmol/L 组仅 48 h 变化明显,与对应浓度组的 0 h 比较,差异有统计学意义(0 mmol/L 组: $F = 2715.43, P < 0.01$; 6 mmol/L 组: $F = 22.05, P < 0.01$),而 20、30 mmol/L 组变化幅度较小,与对应组的 0 h 比较,差异无统计学意义(20 mmol/L 组: $F = 9.34, P > 0.05$; 30 mmol/L 组: $F = 9.45, P > 0.05$)。从培养时间看,培养 24、48 h 后,红细胞内的 ATP 含量均随着葡萄糖浓度增加而不断升高,与对应时间点的 0 mmol/L 比较,差异有统计学意义(24 h: $F = 24.03, P < 0.01$; 48 h: $F = 6.41, P < 0.01$),见图 1。

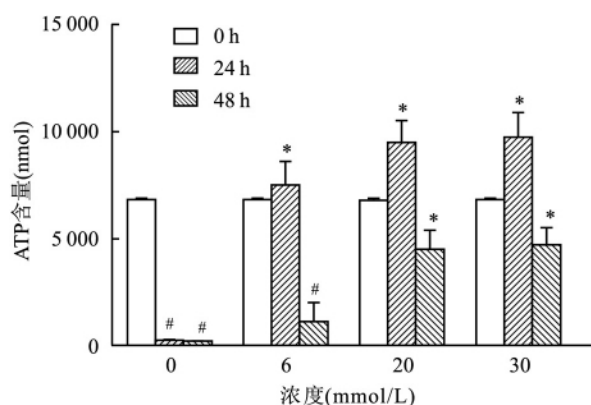


图 1 不同浓度葡萄糖对红细胞内 ATP 含量的影响
与 0 h 比较: # $P < 0.05$; 与 0 mmol/L 组比较: * $P < 0.05$

2.2 不同浓度葡萄糖对红细胞内 HK 活性的影响

在不同浓度葡萄糖组,随着孵育时间延长,各不同浓度葡萄糖组红细胞内 HK 活性不断下降,其中 0 和 6 mmol/L 组下降幅度较大,与对应浓度组的 0 h 比较,差异有统计学意义(0 mmol/L 组: $F = 38.25, P < 0.05$; 6 mmol/L 组: $F = 13.66, P < 0.05$),而 20 和 30 mmol/L 组仅 48 h 与对应浓度组的 0 h 比较,差异有统计学意义(20 mmol/L 组: $F = 6.93, P < 0.05$; 30 mmol/L 组: $F = 7.09, P < 0.05$);而在培养

24、48 h 后,红细胞内 HK 活性均随着葡萄糖浓度的增加而增高,与对应时间点的 0 mmol/L 组比较,差异有统计学意义(24 h: $F = 14.4, P < 0.05$; 48 h: $F = 6.72, P < 0.05$),见图 2。

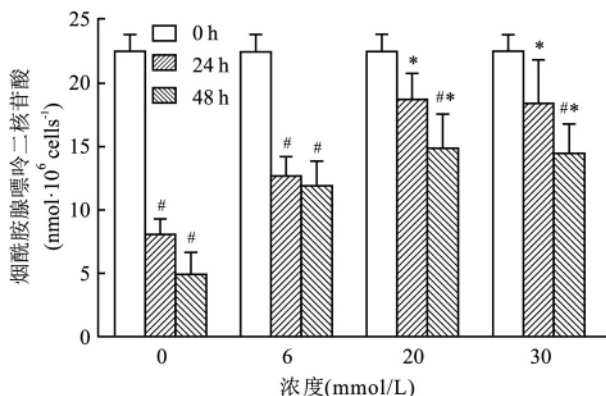


图2 不同浓度葡萄糖对红细胞内 HK 活性的影响
与 0 h 比较: # $P < 0.05$; 与 0 mmol/L 组比较: * $P < 0.05$

2.3 不同浓度葡萄糖对红细胞内 PK 活性的影响

在不同浓度葡萄糖组,随着培养时间的延长,各不同浓度葡萄糖组红细胞内 PK 活性不断下降,其中 0 和 6 mmol/L 组下降幅度比较大,与对应浓度组的 0 h 比较,差异有统计学意义(0 mmol/L 组: $F = 125.21, P < 0.05$; 6 mmol/L 组: $F = 29.61, P < 0.05$),而 20 和 30 mmol/L 组下降趋势不明显,与对应浓度组的 0 h 比较,差异无统计学意义(20 mmol/L 组: $F = 2.81, P > 0.05$; 30 mmol/L 组: $F = 2.07, P > 0.05$);而在培养 24、48 h 后,红细胞内的 PK 活性随着葡萄糖浓度的增加而稳步上升,30 mmol/L 组与对应时间点的 0 mmol/L 组比较,差异有统计学意义(24 h: $F = 5.09, P < 0.05$; 48 h: $F = 4.04, P < 0.05$),见图 3。

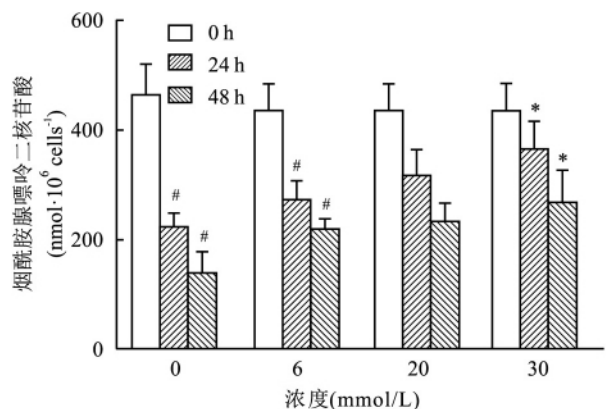


图3 不同浓度葡萄糖对红细胞内 PK 活性的影响
与 0 h 比较: # $P < 0.05$; 与 0 mmol/L 组比较: * $P < 0.05$

2.4 不同浓度葡萄糖对红细胞内 ROS 含量的影响

在不同浓度葡萄糖组,随着时间的延长,各不同浓度葡萄糖组红细胞内 ROS 含量呈上升趋势,其中 0 mmol/L 组变化最为明显,6 mmol/L 组仅 48 h 与对应浓度组的 0 h 比较,差异有统计学意义(0 mmol/L 组: $F = 10.79, P < 0.05$; 6 mmol/L 组: $F = 8.73, P < 0.05$);在培养 24、48 h 后,红细胞内 ROS 的含量随葡萄糖浓度增加而降低,与对应时间点的 0 mmol/L 组比较,差异有统计学意义(24 h: $F = 10.74, P < 0.05$; 48 h: $F = 8.44, P < 0.05$),见图 4。

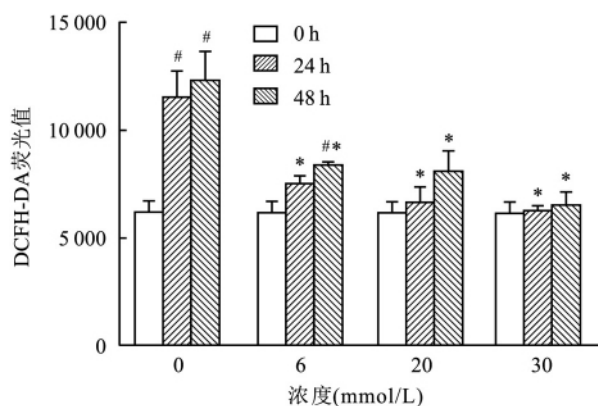


图4 不同浓度葡萄糖对红细胞内 ROS 含量的影响
与 0 h 比较: # $P < 0.05$; 与 0 mmol/L 组比较: * $P < 0.05$

2.5 不同浓度葡萄糖对红细胞凋亡率的影响

在不同浓度葡萄糖组,随着时间延长,各不同浓度葡萄糖组红细胞的凋亡率不断上升,但各不同浓度组仅 48 h 变化最为显著,与对应浓度组的 0 h 比较,差异有统计学意义(0 mmol/L 组: $F = 28.5, P < 0.05$; 6 mmol/L 组: $F = 24.19, P < 0.05$; 20 mmol/L 组: $F = 22.19, P < 0.05$; 30 mmol/L 组: $F = 7.22, P < 0.05$),0 mmol/L 组由于能量供应不充足,红细胞凋亡率上升尤其显著;在培养 24、48 h 后,红细胞凋亡率随葡萄糖浓度增加而下降,与对应时间点的 0 mmol/L 组比较,仅 48 h 的差异有统计学意义($F = 17.66, P < 0.05$),见表 1、图 5。

表1 不同浓度葡萄糖对红细胞凋亡率的影响(%, $n = 3, \bar{x} \pm s$)

时间	0 mmol/L 组	6 mmol/L 组	20 mmol/L 组	30 mmol/L 组
0 h	5.33 ± 1.75	5.33 ± 1.75	5.33 ± 1.75	5.33 ± 1.75
24 h	9.94 ± 1.77	8.13 ± 2.77	6.82 ± 0.92	6.65 ± 1.39
48 h	35.44 ± 8.77 [#]	17.58 ± 2.06 ^{#*}	12.4 ± 1.32 ^{#*}	10.63 ± 2.12 ^{#*}

与 0 h 比较: # $P < 0.05$; 与 0 mmol/L 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

糖尿病微血管病变是糖尿病特有的一种并发

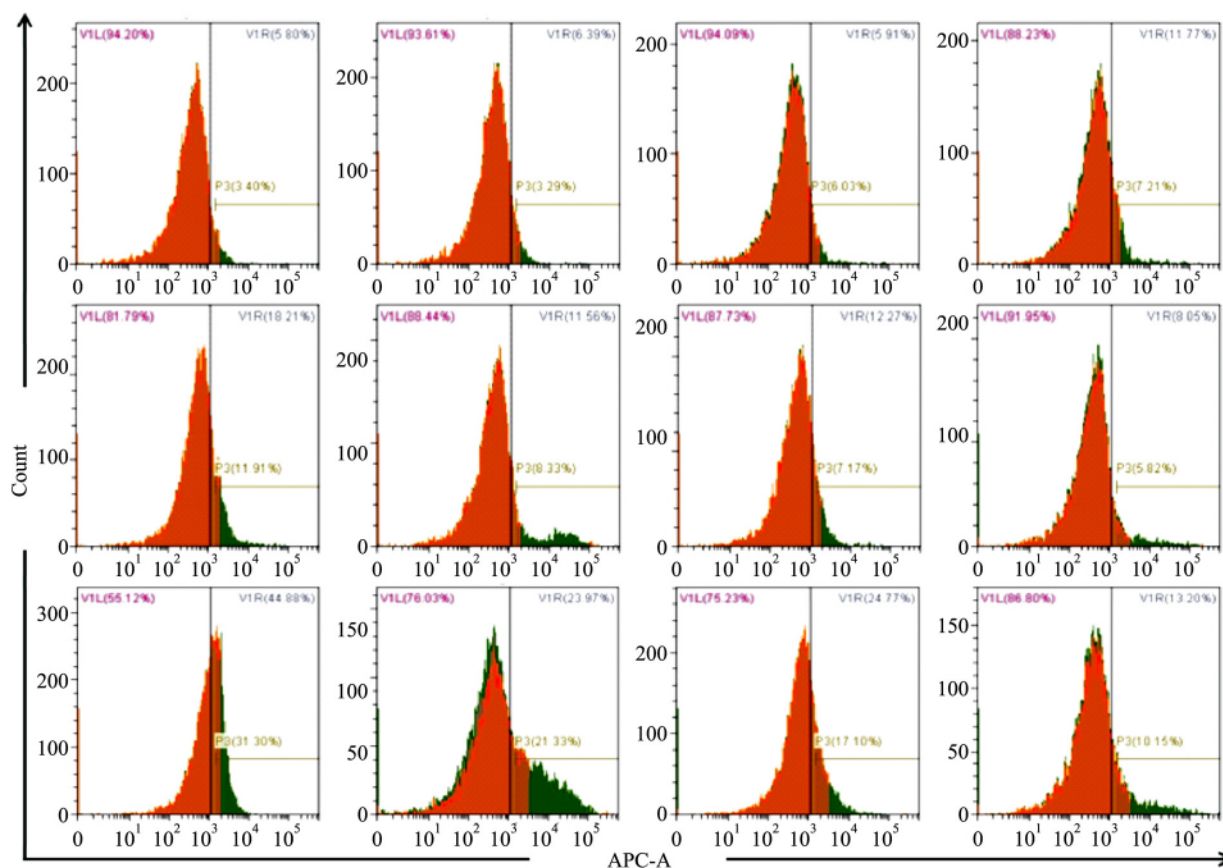


图5 流式细胞仪检测不同浓度葡萄糖对红细胞凋亡的影响

症,其主要表现为血管基底膜病变和微循环异常^[4]。微循环异常除血流动力学改变外主要体现在红细胞方面。红细胞变形能力和生理功能的正常是保证微循环的必要条件。早在20世纪60年代就有文献提出维系红细胞形态需要ATP提供能量,红细胞变形能力与红细胞代谢活性密切相关^[5]。葡萄糖在葡萄糖转运蛋白GLUT1的作用下易化扩散进入红细胞,在红细胞内,约90%的葡萄糖进行糖酵解,其余10%进入磷酸戊糖途径,因此糖酵解是红细胞获得ATP的唯一途径。HK和PK是糖酵解途径的关键酶,调控着ATP生成的速率和量,对维持红细胞形态和功能起到至关重要的作用。有研究^[6-11]表明糖尿病患者红细胞内HK和PK活性高于正常人。本研究结果表明,短期葡萄糖体外孵育的条件下,随着葡萄糖浓度增加,红细胞内ATP含量逐渐增高,HK和PK活性也不断增高。据此推测,红细胞外葡萄糖浓度越高,易化扩散进入红细胞内的葡萄糖越多,关键酶活性越高,产生的ATP越多。然而HK和PK活性均随培养时间延长逐渐下降,可能与红细胞内葡萄糖的逐渐消耗减少及体外

细胞培养状态有关。也有研究^[12]报道葡萄糖经糖酵解代谢时产生的代谢中间物6-磷酸葡萄糖增加到一定量时会抑制HK活性,这也可能是引起红细胞内HK活性随时间延长下降的原因之一。此外,胞外葡萄糖浓度越高,进入胞内的糖量越多。与6 mmol/L组比较,胞内ATP含量明显增高,说明高浓度葡萄糖代谢产生的过量ATP,也可能反馈性抑制HK和PK活性。

在人体血液中,红细胞是数量最多的血细胞。红细胞运输氧气的功能使其不断与细胞内外的氧自由基接触,且其细胞膜上含有丰富的不饱和脂类,因此红细胞极易受到氧自由基的氧化损伤。已有研究证实^[3],长期慢性高血糖会引起ROS过度产生或积累,进而引发严重的病理改变,例如微血管及大血管异常。其原因主要是由于高浓度葡萄糖使内源性ROS形成增加,激活 Ca^{2+} 通道,导致红细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,并直接激活钙敏感的 K^{+} 通道。这进一步导致红细胞膜发生超极化而使 K^{+} 离子泄漏,从而提高了 Cl^{-} 排出的电驱动力^[13]。最后,KCl随胞液从细胞中渗出,使细胞体积减少以及膜完整性丧

失,细胞膜表面磷脂酰丝氨酸外翻,继而引起红细胞衰亡的发生。Vitak et al^[4]报道葡萄糖自氧化、脂质过氧化以及 Amadori 产物和晚期糖基化终末产物的形成是糖尿病患者红细胞内自由基产生的主要原因。本研究结果显示,与 6 mmol/L 组比较,高糖组红细胞内 ROS 及衰亡率均降低,说明短时间内高糖尚不能引起红细胞发生氧化应激而引起细胞衰亡。短期高糖培养减少 ROS 的原因可能是由于进入红细胞内的葡萄糖增多会通过磷酸戊糖途径产生的更多的 NADPH,进而增加抗氧化物质谷胱甘肽的生成,阻止了 ROS 的过度产生;亦或是稳定的糖基化终末产物还未形成,自由基形成少,不能引起红细胞氧化损伤。与此相反,0 mmol/L 组红细胞内 ROS 和衰亡率均较其他组高,说明能量匮乏可以刺激红细胞发生氧化应激,导致红细胞衰亡。

参考文献

- [1] John A N, Jiang F X. An overview of type 2 diabetes and importance of vitamin D3-vitamin D receptor interaction in pancreatic beta-cells [J]. J Diabetes Complications, 2017, 32(4): 429-43.
- [2] Lippi G, Nybo M, Cadamuro J, et al. Blood Glucose determination: effect of tube additives [J]. Adv Clin Chem, 2018, 84: 101-23.
- [3] Mukai N, Kiyohara Y. Diabetes and cancer risk: evidence from epidemiological studies [J]. Nihon Rinsho, 2016, 74(Suppl 2): 401-4.
- [4] Revin V V, Klenova N A, Gromova N V, et al. Physical and chemical processes and the morphofunctional characteristics of human erythrocytes in hyperglycaemia [J]. Front Physiol, 2017, 8: 606.
- [5] Mutlu N M, Peker T T, Soyak B, et al. Red cell distribution width in diagnosis of brain death [J]. Transplant Proc, 2019, 51(7): 2189-91.
- [6] Kodippili G C, Putt K S, Low P S. Evidence for three populations of the glucose transporter in the human erythrocyte membrane [J]. Blood Cells Mol Dis, 2019, 77: 61-6.
- [7] Davoudi S, Sobrin L. Novel genetic actors of diabetes-associated microvascular complications: retinopathy, kidney disease and neuropathy [J]. Rev Diabet Stud, 2015, 12(3/4): 243-59.
- [8] Nakao M, Nakao T, Yamazoe S. Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cells [J]. Nature, 1960, 187: 945-6.
- [9] Bhise S, Rao J, Hegde M, et al. Type 2 diabetes differentially affects the substrate saturation kinetic attributes of erythrocyte hexokinase and phosphofructokinase [J]. FEBS Lett, 2020, 594(2): 240-50.
- [10] Santos R B, Da Silva R P, Otsuka F A M, et al. An HPLC method for the determination of adenosine diphosphate: An important marker of hexokinase activity in metabolic diseases [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33(4): e4473.
- [11] Mali A V, Bhise S S, Hegde M V. Altered erythrocyte glycolytic enzyme activities in type-II diabetes [J]. Indian J Clin Biochem, 2016, 31(3): 321-5.
- [12] Jagadish S, Hemshekhar M, Naveen Kumar S K, et al. Novel oxo-lane derivative DMTD mitigates high glucose-induced erythrocyte apoptosis by regulating oxidative stress [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 334: 167-79.
- [13] Almasry M, Jemaà M, Mischtelli M, et al. Camalexin-induced cell membrane scrambling and cell shrinkage in human erythrocytes [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(2): 731-41.
- [14] Vitak T, Yurkiv B, Wasser S, et al. Effect of medicinal mushrooms on blood cells under conditions of diabetes mellitus [J]. World J Diabetes, 2017, 8(5): 187-201.

Effects of different concentrations of glucose on energy metabolism of red blood cells

Li Xuyan, Sun Mingyue, Su Yan, et al

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Baotou Medical College, Baotou 014000)

Abstract Objective To investigate the effects of different concentrations of glucose on the energy metabolism of red blood cells (RBC) *in vitro* and its molecular mechanism. **Method** Fresh anticoagulant blood was collected from 6 healthy adults. The white blood cells and plasma were removed by centrifugation. After washing RBC three times with PBS respectively, the 6 people's RBC were gently mixed and divided into 4 groups. D-glucose was added to make a final concentration of 0, 6, 20, 30 mmol/L, respectively. After incubation at 37 °C for 0, 24 and 48 hours, some of the RBC suspension was taken out to detect eryptosis, ATP concentration, hexokinase (HK) activity, pyruvate kinase (PK) activity, reactive oxygen species (ROS) content and hemolysis rate by using flow cytometry and multi-function microplate reader. The experimental results were analyzed by one-way ANOVA. **Results** Compared with the 0 mmol/L group, after incubating RBC with glucose at 6, 20, 30 mmol/L for 24 h and 48 h,

丹参酮 II A 对大鼠脑缺血后 PTEN-PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响

徐璇, 汤其强

摘要 目的 探讨丹参酮 II A (TSA) 调节人第 10 号染色体的磷酸酶 (PTEN) 对大鼠脑缺血后自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 的作用机制。方法 建立大鼠脑缺血模型 (MCAO), 并对成功建立 MCAO 的大鼠给予 TSA 处理。实验分为 3 组: 对照组 (NC 组)、手术组: MCAO + 生理盐水组 (MCAO 组) 和 MCAO + TSA 组 (TSA 组)。采用行为学评分、免疫组化及 Western blot 检测组织内各蛋白的表达。结果 与 NC 组比较, TSA 组 PTEN 蛋白的表达降低, PI3K、AKT、mTOR 的表达水平增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 MCAO 组比较, TSA 组的 PTEN 蛋白的表达增加, PI3K、AKT、mTOR 的表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 TSA 通过增强脑缺血大鼠 PTEN 的表达, 减少自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 的表达水平, 减轻脑缺血后脑细胞炎症, 从而保护大鼠的脑组织。

关键词 丹参酮 II A; PTEN; PI3K; 脑缺血

中图分类号 R 743.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)11-1706-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.012

PTEN 蛋白是 10 号染色体上的磷酸酶, 是胞内磷脂酰肌醇激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 的初级磷酸酶^[1], 通过降低 PI3K 的磷酸化, 减少信号通路蛋白激酶 B (protein kinase B, PI3K) / 雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的表达, 参与细胞的增殖、分化等多种功能^[2]。研究^[3]表明 PTEN 蛋白在脑缺血损伤后氧化增加, 导致自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 表达的增强, 从而加重脑损伤。减少 PTEN 蛋白的氧化, 对脑组织的保护具有重要意义。故寻找抑制 PTEN 氧化的新型药物至关重要。丹参酮 II A (tanshinone II A, TSA) 是植物丹参的提取物, 具有活血化瘀、清除氧自由基等功效, 在临床上常作为心脑血管疾病患者的治疗用药^[4]。研究^[5]表明 TSA 具有明确的调节自噬通路 PI3K/AKT 从而保护脑组织的作用。但是 TSA 对 PTEN/PI3K 信号通路的调节暂无研究。该研究拟探讨 TSA 调节 PTEN 对大鼠脑缺血后自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 TSA 购自美国 Selleck 公司, 配比浓度为 10 mg/kg^[6], 术前连续灌胃 4 d; 6 月龄健康雄性 SD 大鼠共 80 只, 体质量 230 ~ 280 g, 购自济南

the HK activity, PK activity, and ATP content in the RBC all increased, and upward trend with increasing glucose concentration, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); while ROS content and decay rate decreased, and decreased with increasing glucose concentration, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). After culturing erythrocytes with different concentrations of glucose (concentrations of 0, 6, 20, 30 mmol/L) for 48 h, the ROS content and erythrocyte decay rate in RBC of different concentrations increased with the incubation time, compared with 0 h, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); HK activity and PK activity gradually decreased, compared with 0 h, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The ATP content decreased in a fluctuating manner, and compared with 0 h, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Short-term high-glucose culture of RBC in vitro not only strengthens the energy metabolism in RBC, but also reduces the oxidative stress and eryptosis. However, no glucose supply leads to gradually exhausted ATP and increased oxidative stress and eryptosis.

Key words red blood cells; glucose; energy metabolism; eryptosis