

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.13.007

人肾小球血管内皮细胞胰岛素抵抗模型的建立*

李 甜¹ 祖力皮亚·阿布拉² 张雁潮¹ 张博翔¹ 彭小雨¹ 毛新民^{2Δ}

(1 新疆医科大学基础医学院组织胚胎教研室 新疆 乌鲁木齐 830011; 2 新疆医科大学中医学院 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的:采用不同浓度的棕榈酸与葡萄糖在体外诱导建立人肾小球内皮细胞(Human glomerular endothelial cells, HRGEC)胰岛素抵抗模型。方法:以人肾小球内皮细胞为研究对象,不同浓度棕榈酸(100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{mol/L}$)与不同浓度的葡萄糖(20, 30, 40, 50, 60 mmol/L)分别作用细胞 24 小时和 48 小时,应用 MTT 法和葡萄糖氧化酶法检测棕榈酸和葡萄糖对 HRGEC 存活率与葡萄糖消耗量的影响,蛋白免疫印迹法检测 P-IRS、IRS、AKT 和 p-AKT (Ser473)的影响。结果:1、当棕榈酸 500 $\mu\text{mol/L}$ 干预细胞 24 小时,与正常组比较,细胞活性显著下降($P<0.01$),棕榈酸浓度大于或等于 300 $\mu\text{mol/L}$ 干预细胞 48 小时,细胞存活率显著降低($P<0.01$)。与空白组比较,300 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸干预细胞 24 小时能够明显的降低细胞的葡萄糖消耗($P<0.05$);200 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 干预细胞 48 小时能够明显的降低细胞的葡萄糖消耗($P<0.01$)。2、不同浓度葡萄糖刺激人肾小球内皮细胞(HRGEC)24 小时和 48 小时,与空白组比较,各组细胞的存活率与对照组比较均无显著变化($P>0.05$)。与空白组比较,40 mmol/L 、50 mmol/L 、60 mmol/L 葡萄糖干预细胞 24 小时能够降低人肾小球内皮细胞的葡萄糖消耗($P<0.05$)。与空白组比较,30 mmol/L 、40 mmol/L 、50 mmol/L 、60 mmol/L 葡萄糖干预细胞 48 小时能够明显降低人肾小球内皮细胞的葡萄糖消耗量($P<0.01$)。3、不同浓度的葡萄糖刺激人肾小球内皮细胞(HRGEC)24 小时后,结果显示,50 mmol/L 、60 mmol/L 葡萄糖刺激细胞 24 小时能降低 P-IRS/IRS 和 p-AKT/AKT (Ser473)的水平($P<0.01$),而其他组无明显显著变化($P>0.05$)。结论:高糖诱导方法能够建立 HRGEC 细胞胰岛素抵抗模型,具有建模周期短、容易重复、可控性强的优点,可用于糖尿病胰岛素抵抗机制的研究和中药成分的筛选研究。

关键词:人肾小球内皮细胞;胰岛素抵抗模型;高糖;葡萄糖消耗

中图分类号:R-33;Q593;R587.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)13-2435-05

Establishment of Insulin Resistance Model in Human Glomerular Endothelial Cells*

LI Tian¹, Zulipiya·abula², ZHANG Yan-chao¹, ZHANG Bo-xiang¹, PENG Xiao-yu¹, MAO Xin-min^{2Δ}

(1 Department of Histology and embryology, School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China; 2 College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

ABSTRACT Objective: To establish Human glomerular endothelial cells (Human glomerular endothelial cells, HRGEC) model of insulin resistance by the different concentrations of palmitic acid and glucose in vitro induced. **Methods:** Human glomerular endothelial cells as the research object, the different concentration of palmitic acid (100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{mol/L}$) and different concentrations of glucose (20, 30, 40, 50, 60 mmol/L) for 24 hours and 48 hours respectively, to detect palmitic acid and glucose effects on glucose consumption and HRGEC survival determined by MTT method and glucose oxidase method, to detect P-IRS, the IRS, AKT and P-AKT (Ser473) by protein immunoblot method. **Results:** 1. When palmitate was given 500 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h, cell activity significantly decreased compared with the normal group($P<0.01$), and cell survival rate significantly decreased when palmitate concentration was more than or equal to 300 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h ($P<0.01$). Compared with the control group, palmitate intervention at 300 $\mu\text{mol/L}$, 400 $\mu\text{mol/L}$ and 500 $\mu\text{mol/L}$ for 24 hours could significantly reduce the glucose consumption of cells ($P<0.05$). Intervention at 200 $\mu\text{mol/L}$, 300 $\mu\text{mol/L}$, 400 $\mu\text{mol/L}$ and 500 $\mu\text{mol/L}$ for 48 hours significantly reduced glucose consumption ($P<0.01$). Compared with the blank group, glucose intervention of 40 mmol/L , 50 mmol/L and 60 mmol/L for 24 hours could reduce glucose consumption of human glomerular endothelial cells ($P<0.05$). Compared with the blank group, the glucose consumption of human glomerular endothelial cells was significantly reduced by the intervention of 30 mmol/L , 40 mmol/L , 50 mmol/L and 60 mmol/L for 48 hours($P<0.01$). 3. After 24 h of glucose stimulation of human glomerular endothelial cells (HRGEC) at different concentrations, the results showed that the levels of p-IRS/IRS and p-AKT/AKT (Ser473) decreased with glucose stimulation of 50 mmol/L and 60 mmol/L for 24 hours ($P<0.01$), while no significant changes were observed in other groups ($P>0.05$). **Conclusion:** The high glucose induction method could establish the insulin resistance model of HRGEC

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2018D01C181)

作者简介:李甜,副教授,主要研究方向:糖尿病机制及药物研究

Δ 通讯作者:毛新民,教授,博士生导师, E-mail: mxm3277@sina.com

(收稿日期:2020-02-03 接受日期:2020-02-28)

cells, which has the advantages of short modeling period, easy repetition and strong controllability, and could be used for the study of the mechanism of insulin resistance in diabetes mellitus and the screening of traditional Chinese medicine components.

Key words: Human glomerular endothelial cells; Insulin resistance model; High glucose; Glucose consumption

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593; R587.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)13-2435-05

前言

2型糖尿病是最常见的糖尿病, 占所有病例的90%以上。胰岛素抵抗(IR)是2型糖尿病的核心机制^[1]。糖尿病肾病是2型糖尿病的主要并发症之一, 肾小球血管内皮细胞损伤是糖尿病肾病的主要环节之一^[2]。血管内皮细胞上有高密度的胰岛素受体, 内皮细胞可以通过多种机制促进糖尿病的并发症的发生^[3-5]。建立肾小球血管内皮胰岛素抵抗模型有利于深入研究糖尿病肾病的发生机制。目前, 研究报道较为成熟的胰岛素抵抗模型主要通过葡萄糖^[6]、棕榈酸^[7,11]或胰岛素等诱导模型等, 但均局限于肝细胞^[8,10]、脂肪细胞^[7,11]、肌细胞^[9], 针对人肾小球血管内皮细胞的胰岛素抵抗模型国内外尚未报道。本研究分别以高糖和棕榈酸两种方法探讨诱导人肾小球血管内皮细胞为胰岛素抵抗模型, 为进一步研究内皮细胞胰岛素抵抗奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肾小球内皮细胞 (Human Glomerular Endothelial Cells, HRGEC) 购自北纳生物科技公司, RPMI640, 美国 hyclone 公司; 二甲双胍(美国 MCE 公司); 胎牛血清(FBS, 美国 Gibco 公司); 二甲基亚砜(DMSO, 美国 sigma 公司); 噻唑蓝(MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒, 武汉碧云天生物公司); 葡萄糖氧化酶法试剂盒(普利莱基因技术有限公司)葡萄糖(美国 sigma 公司); 棕榈酸(美国 sigma 公司)。兔抗单克隆抗体 P-IRS、IRS 和 p-AKT(Ser473)、AKT 均购自美国 CST 公司。

1.2 仪器与设备

倒置荧光显微镜(IX71-22PHFL, 奥林巴斯); 二氧化碳培养箱(MCO-15AC, 三洋); 全自动酶标仪(Mutliscan MK3, 赛默飞); 电子精密天平(BT124S 赛多利斯); 台式高速冷冻离心机(5417R, 艾本德)。

1.3 实验方法

1.3.1 HGREC 细胞培养 细胞复苏后, 加入含 10% FBS 的 RPMI640 培养液的完全培养基, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养至细胞汇合度达到 90%以上, 用 0.25% 的胰酶消化, 每 2 天按体积比为 1:3 传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3.2 细胞分组和干预 将细胞接种于 96 孔板中, 当细胞浓度为 1×10^6 时可用于实验。(1)棕榈酸组: 正常组细胞培养基棕榈酸浓度为 0, 其余 5 个模型组的浓度分别为 100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸。每组 5 孔, 分别于 24h 和 48h 终止培养。(2)葡萄糖组: 正常组采用 10% FBS 的 RPMI640, 其余 5 个模型组分别为 20 mmol/L、30 mmol/L、40 mmol/L、50 mmol/L、60 mmol/L 葡萄糖。每组 5 孔, 分别于 24 h 和 48 h 终止培养。筛选出最佳的作用浓度和时间。

1.3.3 MTT 实验测定 HGREC 细胞活性 葡萄糖消耗实验结束后, 每孔加入 25 μL MTT, 放入 37℃ 恒温箱中, 反应 4 h 后取出置于酶标仪中检测, 加入终止培养液, 小心弃去孔内培养上清液, 每孔加入 DMSO 共 150 μL , 充分振荡 10 min, 使结晶充分溶解。用酶标仪于 492 nm 波长处测定各孔的吸光度, 用该值代表细胞活性。记录数值并进行相应的统计学分析。

1.3.4 葡萄糖氧化酶法实验 用葡萄糖氧化酶法(Glucose Oxidase Method, GOD)检测培养基葡萄糖的含量。取经过不同处理的细胞上清为样品。将葡萄糖测定试剂盒内 10 mL R1 和 90 mL R2 试剂均匀混合后形成工作液。空白管中加入蒸馏水, 校准管中加入校准液, 样品管中加入样品, 10 mM 葡萄糖标准品用蒸馏水或与样本缓冲液一致的液体稀释为 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 μM 。再分别加入工作液, 混匀后 37℃ 水浴 15min, 取每个管中 200 μL 液体至 96 孔板中, 在酶标仪上, 以波长 505 nm 得到 OD 值, 绘制标准曲线并计算葡萄糖浓度, 再根据前后葡萄糖含量计算葡萄糖消耗量。

1.3.5 蛋白免疫印迹 取对数生长期细胞, 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 6 孔板中培养。培养 24 小时和 48 小时后收集细胞, RIPA 细胞裂解液裂解细胞, 提取各组细胞中总蛋白, 测样品蛋白的含量。取蛋白样品 40 μg 上样, SDS-PAGE 电泳后转 PVDF 膜, 转膜 120 min。常规封闭, P-Akt, Akt, IRS-1, P-IRS1, 1:1000; cell signing technology, 美国) GAPDH, β -actin (1: 5000) 孵育 1 h。4℃ 孵育过夜, 洗膜后分别加入相应的加入辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗兔二抗(1: 5000, 鼎国公司), 4℃ 避光孵育 1 h, Western blot 洗涤液洗涤 3 次。在室温下, 使用辣根显色和图像分析仪(biorad laboratories)可视化条带。使用 imagej 软件对蛋白质印迹上的蛋白质条带进行密度测量。

1.4 统计学分析

所测定数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 数据处理采用 PRISM6.01 统计学软件经方差分析齐后采用 t 检验, $P < 0.05$, 认为有统计学差异, $P < 0.01$ 认为有极显著差异。

2 结果

2.1 不同浓度棕榈酸作用不同时间对 HRGEC 细胞存活率和葡萄糖消耗量的影响

采用 MTT 法分别检测不同浓度棕榈酸和葡萄糖对 HRGEC 增殖作用影响。如图所示, 在不同浓度(100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$)棕榈酸葡萄糖刺激人肾小球内皮细胞(HRGEC)24 小时后, 与空白组比较, 500 $\mu\text{mol/L}$ 能明显的降低细胞的存活率; 其他组均无显著变化。48 小时后, 300 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸能明显降低细胞的存活率。不同浓度(100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$) 棕榈酸刺激肾小球内皮

细胞 (HGREC)24 小时后,与空白组比较,300 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 能够明显的降低细胞的葡萄糖消耗;不同

浓度棕榈酸刺激细胞 48 小时后,200 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 能够明显的降低葡萄糖消耗。

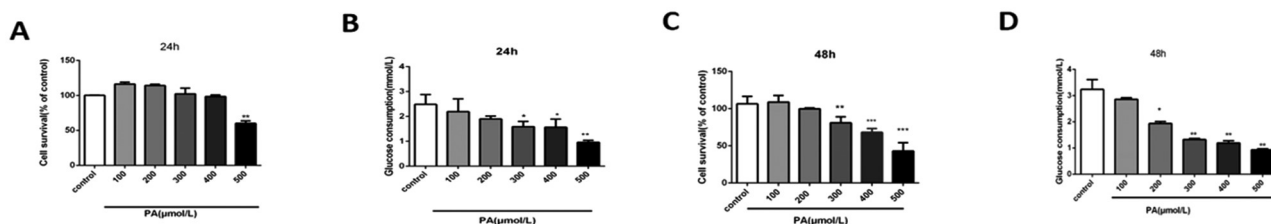


图1 不同浓度棕榈酸作用不同时间对 HRGEC 细胞存活率和葡萄糖消耗量的影响

Fig.1 Effects of palmitic acid with different concentration and different time on survival rate and glucose consumption on HRGEC cells

2.2 不同浓度高糖作用不同时间对 HRGEC 细胞存活率和葡萄糖消耗的影响

不同浓度葡萄糖刺激人肾小球内皮细胞(HGREC)24 h 后,在不同浓度(20 mmol/L、30 mmol/L、40 mmol/L、50 mmol/L、60 mmol/L)葡萄糖刺激人肾小球内皮细胞(HGREC)24 h 和 48 h 后,与空白组比较,各组细胞的存活率与对照组比较均无显著变化。在不同浓度(20 mmol/L、30 mmol/L、40 mmol/L、50

mmol/L、60 mmol/L)葡萄糖刺激人肾小球内皮细胞(HGREC)24 h 后,与空白组比较,40 mmol/L、50 mmol/L、60 mmol/L 能够降低人肾小球内皮细胞的葡萄糖消耗。不同浓度葡萄糖刺激人肾小球内皮细胞(HGREC)48h 后,与空白组比较,30 mmol/L、40 mmol/L、50 mmol/L、60 mmol/L 能够明显降低人肾小球内皮细胞的葡萄糖消耗量。

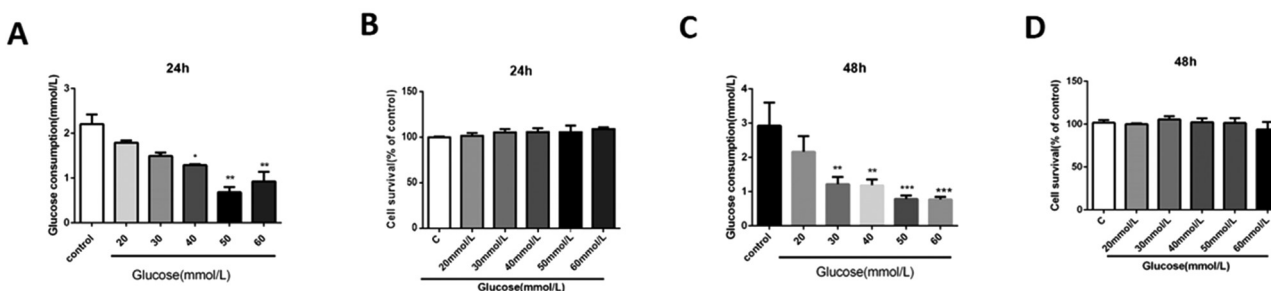


图2 不同浓度高糖作用不同时间对 HRGEC 细胞存活率和葡萄糖消耗的影响

Fig.2 Effects of high glucose with different concentration and different time on survival rate and glucose consumption on HRGEC cells

2.3 不同浓度葡萄糖作用于 HGREC 细胞 24 小时 IRS-1, p-IRS-1, Akt, p-Akt 蛋白的表达

不同浓度的葡萄糖(20 mmol/L、30 mmol/L、40 mmol/L、50 mmol/L、60 mmol/L)刺激人肾小球内皮细胞 (HGREC)24 h 后 IRS-1, p-IRS-1, Akt, p-Akt 蛋白的表达的影响。结果显示,40

mmol/L、50 mmol/L、60 mmol/L 刺激细胞 24 h 能降低 p-akt/akt ($P<0.05$),其他组无明显显著变化;50 mmol/L、60 mmol/L 刺激细胞 24 h 能降低 p-IRS1/IRS1($P<0.05$)(Ser473)的水平,而其他组无明显显著变化。

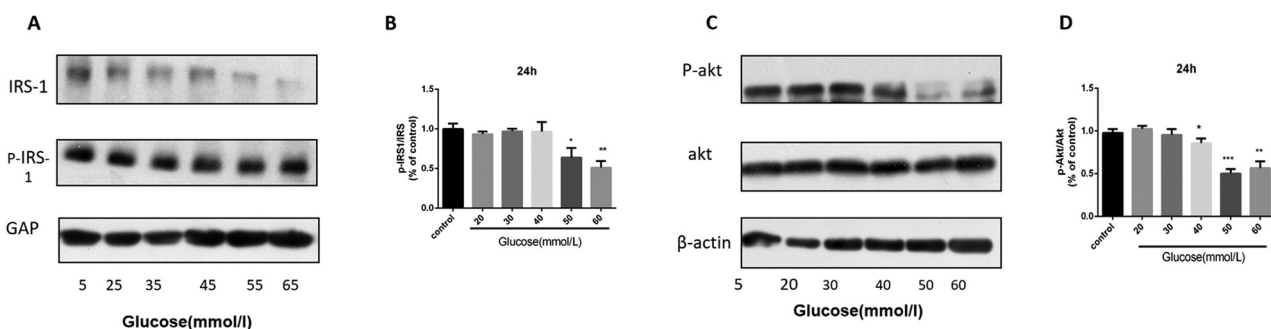


图3 不同浓度葡萄糖作用于 HGREC 细胞 24 小时 IRS-1, p-IRS-1, Akt, p-Akt 蛋白的表达

Fig.3 The expression of IRS-1, p-IRS-1, Akt, and p-AKT proteins in HGREC cells treated with glucose at different concentrations for 24 hours

3 讨论

胰岛素抵抗是指组织细胞对胰岛素的敏感性降低,其实质为胰岛素介导的细胞糖代谢能力降低^[12,13]。产生胰岛素抵抗的原因有很多,如糖脂代谢紊乱、高胰岛素等^[14,15]。许乐等通过采

用高胰岛素、高糖联合诱导 Hep G2 细胞建立胰岛素抵抗模型,结果表明高胰岛素($10^{-6} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和高糖培养基($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理细胞 48 h,葡萄糖消耗量降低^[10]。Nitya Shree 等采用 500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸诱导脂肪细胞 24 小时建立胰岛素抵抗模型^[7]。人肾小球血管内皮细胞上有高密度的胰岛素受体,在高糖高脂

刺激下,降低了细胞对葡萄糖的分解利用能力,产生胰岛素抵抗^[16-18]。本实验分别采用高浓度葡萄糖和棕榈酸诱导人肾小球血管内皮细胞,研究葡萄糖和棕榈酸的作用时间、浓度和产生胰岛素抵抗关系,建立体外细胞模型,并从葡萄糖消耗和胰岛素抵抗通路的关键蛋白两个方面进行验证胰岛素抵抗模型的建立。

葡萄糖为组织和细胞提供能量。生理性饥饿、剧烈运动、营养不良状态血糖降低,肥胖、糖尿病等疾病血糖升高。在胰岛素抵抗的状态下,葡萄糖消耗明显降低^[19,20]。我们通过采用高浓度棕榈酸和葡萄糖在体外诱导培养法建立人肾小球内皮细胞胰岛素抵抗模型。本实验的结果显示,与正常组比较,当棕榈酸浓度大于 500 $\mu\text{mol/L}$ 作用细胞 24 小时,肾小球内皮细胞形态相对受损严重,细胞活性显著下降,同时对葡萄糖的消耗量显著降低;当棕榈酸浓度大于 300 $\mu\text{mol/L}$ 作用细胞 48 小时肾小球内皮细胞存活率明显降低,同时葡萄糖的消耗量降低。这说明棕榈酸对人肾小球内皮有一定的损伤,葡萄糖消耗量的降低与细胞死亡可能有关。而当葡萄糖浓度大于 40 mmol/L 作用 24 小时,肾小球内皮细胞存活率无显著变化,但细胞对葡萄糖的消耗量明显降低;当葡萄糖浓度大于 30 mmol/L 作用 48 小时,各组细胞存活率无显著变化,同时对葡萄糖消耗量显著增加。通过上述实验可见葡萄糖诱导人肾小球血管内皮细胞胰岛素抵抗模型较为安全和稳定,细胞的葡萄糖消耗量减少,能够产生葡萄糖摄取和利用的障碍,胰岛素抵抗模型建立基本成功。胰岛素抵抗模型的建立对于胰岛素抵抗机制的研究以及药物对胰岛素抵抗的作用有着重要的意义。目前模型的评价主要通过葡萄糖消耗量,胰岛素信号通路的蛋白表达能够更准确地评价模型的成立^[21-23]。在通常情况下,当细胞外胰岛素信号通过胰岛素受体 IRS1 将信号传递到细胞内后,磷酸化的 IRS1 激活 PI3K,而活化下游的 AKT,使 AKT 转化为磷酸化的 AKT^[24,25]。若上述信号转导途径受阻,尤其是磷酸化水平信号分子降低,最终,致使 IRS1/PI3K/Akt 信号通路活性分析降低,导致胰岛素抵抗,同时出现细胞损伤,出现细胞内功能失调或受损^[26]。通过实验证实当葡萄糖浓度为 50 mmol/L 刺激细胞 24 h 能降低 P-IRS/IRS, P-AKT/AKT 最明显,产生最大的胰岛素抵抗效率,与葡萄糖消耗实验一致。IRS-1 位于细胞膜上,属于酪氨酸激酶活性的受体家族,IRS-1 的磷酸化能向下传递胰岛素信号,激活下游的 AKT 蛋白。一旦磷酸化受体的水平降低,就会阻断胰岛素信号传递,高糖诱导人肾小球血管内皮细胞胰岛素信号 P-IRS 水平,抑制蛋白激酶 AKT,阻断胰岛素信号传递,从而降低细胞葡萄糖利用率,产生胰岛素抵抗^[25,26]。

血管病变是糖尿病的主要并发症之一。内皮细胞位于血管的最内层,内皮细胞损伤是血管损伤的主要环节。内皮细胞上有高密度的胰岛素受体,胰岛素抵抗作为内皮细胞损伤的重要发病机制,与糖尿病糖代谢紊乱、肾小球损伤、肾功能衰竭存在密切的联系^[27,28]。内皮细胞的胰岛素抵抗可以通过多种机制促进糖尿病并发症。胰岛素在葡萄糖的氧化分解利用等起到关键的作用,2 型糖尿病患者肾小球内皮细胞早期可表现出胰岛素抵抗状态,就可观察到肾脏血流动力学异常,表现为肾小球基底膜增厚和毛细血管通透性升高、肾小球高灌注和高滤过,肾血流量和肾小球滤过率(GFR)升高^[27]。这与内皮细胞葡萄糖消

耗能力降低,胰岛素抵抗导致葡萄糖利用障碍密切相关^[2, 29,30]。因此,研究内皮细胞胰岛素抵抗机制对于糖尿病机制研究和药物开发具有重要价值,通过实验表明葡萄糖浓度为 50 mmol/L 的培养液培养细胞 24 小时的人肾小球内皮细胞产生胰岛素抵抗最为可靠和稳定。

参考文献(References)

- [1] Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus[J]. World Journal of Diabetes, 2010, 1(3): 68
- [2] Artunc F, Schleicher E, Weigert C, et al. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature [J]. Nature Reviews Nephrology, 2016, 12(12): 721-737
- [3] Edmond W K Young, David J Beebe. Tutorial Methods for Evaluating Endothelial Function in Humans [J]. Chem Soc REv, 2010, 39(3): 1036-1048
- [4] Maria A Potenza, Flora L Marasciulo, Delia Mitolo Chieppa, et al. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289(2): H813-822
- [5] Muniyappa R, Sowers J R. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction[J]. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 2013, 14(1): 5-12
- [6] 姜保平. 两色金鸡菊茶饮对 2 型糖尿病胰岛素抵抗的预防作用及机制研究[D].北京协和医学院, 2015
- [7] Shree N, Bhonde R R. Conditioned Media From Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells Reverse Insulin Resistance in Cellular Models[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2017, 118(8): 2037-2043
- [8] 李文立, 陈海珍, 张紫虹, 等. 不同浓度胰岛素诱导 HepG2 细胞建立胰岛素抵抗模型[C].中国毒理学会第九次全国毒理学大会, 中国山西太原, 2019
- [9] 王梅, 李拥军, 刘素云, 等. 胰岛素抵抗心肌细胞模型的建立与评价[J].河北医科大学学报, 2012, 33(09): 993-996
- [10] 许乐, 逢晓阳, 芦晶, 等. HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立及其应用[J].核农学报, 2017, 31(09): 1775-1781
- [11] 郭晓农, 杨具田, 牛峰, 等. 胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞模型的建立及鉴定[J].中药材, 2008, 31(2): 258-260
- [12] Xu J, Yang Q, Zhang X, et al. Endothelial adenosine kinase deficiency ameliorates diet-induced insulin resistance [J]. J Endocrinol, 2019, 242(2): 159-172
- [13] Koffi C, Soleti R, Nitiema M, et al. Ethanol Extract of Leaves of Cassia siamea Lam Protects against Diabetes-Induced Insulin Resistance, Hepatic, and Endothelial Dysfunctions in ob/ob Mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 6560498
- [14] Freeman AM, Pennings N. Insulin Resistance[J]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020
- [15] 陆菊明. 胰岛素抵抗与 2 型糖尿病的发生发展[J]. 药品评价, 2014, 11(23): 11-14
- [16] Guo S. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms[J]. Journal of Endocrinology, 2014, 220(2): T1-T23
- [17] David Eddy, Len Schlessinger, Richard Kahn, et al. Relationship of Insulin Resistance and Related Metabolic Variables to Coronary Artery Disease: A Mathematical Analysis[J]. Diabetes Care, 2009, 32

- (2): 361-366
- [18] 刘阳, 秦旭平, 李洁. 血管胰岛素抵抗与 PI3K 通路关系的研究进展[J]. 湘南学院学报(医学版), 2015, 17(04): 72-75
- [19] David L Morris, Kae Won Cho, Yingjiang Zhou, et al. SH2B1 Enhances Insulin Sensitivity by Both Stimulating the Insulin Receptor and Inhibiting Tyrosine Dephosphorylation of Insulin Receptor Substrate Proteins[J]. Diabetes, 2009, 58(9): 2039-2047
- [20] Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, et al. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Enhances Mitogenic Actions of Insulin in Endothelial Cells [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(3): 1794-1799
- [21] 洪郁芝, 李真真. 糖尿病肾病与胰岛素抵抗[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(9): 843-845
- [22] K Hotta, T Funahashi, Y Arita, et al. Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(6): 1595-1599
- [23] Xing JH, Li R, Gao YQ, et al. NLRP3 inflammasome mediate palmitate-induced endothelial dysfunction[J]. Life Sci, 2019, 239: 116882
- [24] Mezza T, Cinti F, Cefalo CMA, et al. β -Cell Fate in Human Insulin Resistance and Type 2 Diabetes: A Perspective on Islet Plasticity[J]. Diabetes, 2019, 68(6): 1121-1129
- [25] Massimo Federici, Assunta Pandolfi, Elena Anna De Filippis, et al. G972R IRS-1 variant impairs insulin regulation of endothelial nitric oxide synthase in cultured human endothelial cells [J]. Circulation, 2004, 109(3): 399-405
- [26] Yarbeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, et al. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 8152-8161
- [27] Han P, Shao M, Guo L, et al. Niclosamide ethanolamine improves diabetes and diabetic kidney disease in mice[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(4): 1071-1084
- [28] Ferruh Artunc, Erwin Schleicher, Cora Weigert, et al. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature[J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(12): 721-737
- [29] Cullen M Taniguchi, Brice Emanuelli, C Ronald Kahn. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(2): 85-96
- [30] Yu S, Zhao H, Yang W, et al. The Alcohol Extract of Coreopsis tinctoria Nutt Ameliorates Diabetes and Diabetic Nephropathy in db/db Mice through miR-192/miR-200b and PTEN/AKT and ZEB2/ECM Pathways [J]. BioMed research international, 2019, 2019, 5280512-5280514

(上接第 2424 页)

- [28] Sun Y, Liu W, Zhang H, et al. Curcumin Prevents Osteoarthritis by Inhibiting the Activation of Inflammasome NLRP3[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2017, 37(10): 449-455
- [29] Scanzello CR, Umoh E, Pessier F, et al. Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(8): 1040-1048
- [30] 殷方明, 肖涟波, 张昀, 等. 柚皮苷抑制胶原诱导小鼠关节炎作用机制的实验研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2016, 31(3): 285-288
- [31] Park SJ, Cheon EJ, Lee MH, et al. MicroRNA-127-5p regulates matrix metalloproteinase 13 expression and interleukin-1 β -induced catabolic effects in human chondrocytes [J]. Arthritis & Rheumatism, 2013, 65(12): 3141-3152
- [32] Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis [J]. Journal of cellular biochemistry, 2011, 112(12): 3507-3514
- [33] Joosten LAB, Netea MG, Fantuzzi G, et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: Contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1 β [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107188
- [34] Takaishi H, Kimura T, Dalal S, et al. Joint Diseases and Matrix Metalloproteinases: A Role for MMP-13 [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2008, 9(1): 47-54
- [35] Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, et al. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation[J]. Osteoarthritis & Cartilage, 2001, 9(6): 539-552
- [36] Majumdar MK, Askew R, Schelling S, et al. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis[J]. Arthritis & Rheumatism, 2014, 56(11): 3670-3674
- [37] 沈鹏飞, 瞿玉兴, 王斌, 等. miR-30a-5p 靶向作用蛋白激酶 B 基因促进骨关节炎患者软骨细胞的凋亡 [J]. 中华医学杂志, 2017, 97(39): 3079-3084
- [38] 陈俊, 林洁, 赵忠胜, 等. 乌头汤对膝关节炎模型大鼠滑膜组织 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(27): 4381-4386