



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109406769 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201811142521.5

(22)申请日 2018.09.28

(71)申请人 李军

地址 832003 新疆维吾尔自治区石河子市  
石河子大学医学院第一附属医院

(72)发明人 李军 李思源 张君 李含晖  
尹亮 火睿 李佳佳 胡颖 王双  
石艳秋 胡倩

(74)专利代理机构 北京方圆嘉禾知识产权代理  
有限公司 11385

代理人 董芙蓉

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

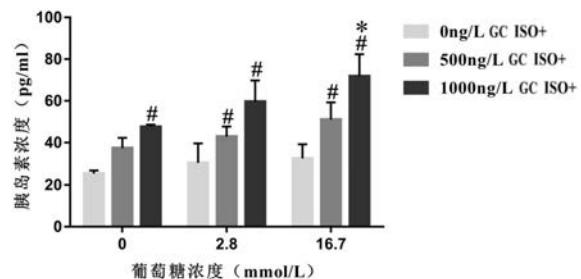
权利要求书2页 说明书8页 附图8页

(54)发明名称

AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的应  
用

(57)摘要

本发明公开了一种AKR在MIN6细胞中胰岛素  
分泌机制研究的应用,在不同浓度葡萄糖环境  
下,设置不同浓度水平的GC干预,通过刺激PKA信  
号通路,并且在添加刺激剂ISO前后,利用FRET技  
术实时定量测定PKA的含量,探讨GC怎样通过第  
二信使PKA信号通路在胰岛 $\beta$ 细胞胰岛素分泌中  
发挥作用,从而进一步补充我们前期关于2型糖  
尿病的发病机制研究中的欠缺,并为新的糖尿病  
靶向治疗药物的研发提供实验室方面的依据。



1.一种AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的应用,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1、细胞培养

用含15%胎牛血清、4.5g/L葡萄糖、2%青链霉素、1%L-谷氨酰胺及1% $\beta$ -巯基乙醇的DMEM培养基,在37℃含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,传代至4~15代用于实验;

步骤2、分组

将MIN6细胞以 $4 \times 10^5$ /孔于6孔培养板中培养,在对数生长期用于实验;一组用于ELISA检测MIN6胞内未添加ISO胰岛素释放量,一组用于ELISA检测MIN6胞内添加ISO胰岛素释放量,细胞分为3部分后分别在无糖、低糖、高糖环境下培养,之后给予不同浓度的G1g:0、500、1000ng/L,干预处理;一组用于FRET技术检测PKA水平;

步骤3、方法

3.1基于FRET技术在不同浓度葡萄糖和GC干预下实时定量检测PKA;

3.2ELISA法检测各组MIN6细胞胰岛素的释放量;

3.2.1采集MIN6细胞胰岛素样品;

(1) MIN6细胞传代于5个6孔培养板,待其贴壁稳定,状态良好;

(2) 小心吸出培养基,换入含2%FBS的培养基,继续在37℃环境下培养;

(3) 培养12h后吸出原有培养基,用Krebs液轻轻冲洗1次,在每孔培养皿加入1ml Krebs液,在37℃环境下孵育2h;

(4) 吸出原有Krebs液,向各孔培养皿中分别加入处理液1ml,空白对照组直接加入1ml Kerbs,37℃培养箱孵育1h;

(5) 分别吸取每孔的细胞上清液,移入1.5ml离心管,做好标记后剪取封口膜密封,保存于-20℃冰箱待测;

3.2.2测定MIN6细胞上清中胰岛素

(1) 准备试剂盒:

(2) 检测程序:

(3) 结果计算与判断:

①以4000pg/ml、2000pg/ml、1000pg/ml、500pg/ml、250pg/ml、125pg/ml、62.5pg/ml、0pg/ml浓度的标准品为横坐标,以相对应的OD值为纵坐标,画出标准曲线图;

②根据测得的细胞上清液样品OD值,在标准曲线上计算出相应胰岛素含量,乘上稀释倍数后得出样品内胰岛素含量;

步骤4、统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差(x±s)表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析,采用双侧检验,P<0.05认为差异具有统计学意义。

2.根据权利要求1所述的AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的应用,其特征在于,步骤3.1具体为:

(1) 在荧光显微镜下观察转染48h后的MIN6细胞,其荧光蛋白表达良好,转染效率80%-90%;

(2) 小心吸出原有培养基,Krebs液冲洗2遍;

(3) 每个培养皿中加入0.5ml Krebs液,放回培养箱;

(4) 任取一个培养皿,放在激光共聚焦显微镜下,定位单个细胞后换用油镜观察;

- (5) 在激光共聚焦计算机软件上设置好激发波长和发射波长范围,开始采集图像;
- (6) 各培养皿根据实验分组依次加入药物;
- (7) 以时间为横坐标、CFP/YFP比值为纵坐标画图。

3. 根据权利要求1所述的AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的应用,其特征在于,所述准备试剂盒具体为:

①打开10×标本稀释液母液包装,按照10×标本稀释液:双蒸水=1:10的比例,加入双蒸水稀释标本稀释液;

②标准品液的配制:打开标准品液包装,用微量移液枪加入500μl双蒸水混匀,将其配制成40ng/ml的溶液;准备8个干净的离心管,分别标记1-8,向管1中加入900μl标本稀释液,管2至管8中各加入500μl标本稀释液;向管1中加入100μl 40ng/ml的标准品溶液混匀,用微量移液枪从其中吸出500μl移至管2,如此反复操作,将各管溶液进行稀释,最后从管7中吸出500μl弃去,管8作为空白对照;

③按照洗涤液母液液:双蒸水=1:10的比例,稀释洗涤液;

④按照标本:双蒸水=1:20的比例,稀释收集到的细胞上清液标本。

4. 根据权利要求1所述的AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的应用,其特征在于,所述检测程序具体为:

①分别吸取100μl的标准品,加入每个反应孔中,充分混匀,在37℃环境下静置40min;

②用稀释好的洗涤液充分洗涤反应板、5次,用滤纸将反应板上的水分吸干;

③除空白组以外,向每个反应孔各加50μl双蒸水和第一抗体工作液,充分混匀,在37℃环境下静置20min;

④用稀释好的洗涤液充分洗涤反应板5次,用滤纸将反应板上的水分吸干;

⑤分别吸取100μl的酶标抗体工作液,加入到每个反应孔中,充分混匀,在37℃环境下静置10min;

⑥用稀释好的洗涤液充分洗涤反应板5次,用滤纸将反应板上的水分吸干;

⑦分别吸取100μl的底物工作液,加入到每个反应孔中,充分混匀,放在37℃环境下避光反应15min;

⑧分别吸取100μl的终止液,加入每个反应孔中,充分混匀;

⑨用Bio-RAD酶标仪在450nm处测OD值,此操作必须在30min内完成;

⑩同样的方法检测待测样品。

5. 权利要求1所述AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的方法在糖尿病靶向治疗药物制备过程中的应用。

## AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学技术领域,具体地说,涉及AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的应用。

### 背景技术

[0002] 前期的相关研究表明,在不同葡萄糖浓度的情况下,不同浓度的GC通过cAMP、DAG、PKC等信号通路途径,上调其在细胞内的含量,对胰岛β细胞分泌胰岛素有促进作用,但是cAMP信号通路的下游信号分子PKA是否影响GC在胰岛β细胞胰岛素的分泌方面的作用,如果影响又是怎样影响GC发挥作用的问题还有待进一步明确。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的应用,在不同浓度葡萄糖环境下,设置不同浓度水平的GC干预,通过刺激PKA信号通路,并且在添加刺激剂ISO前后,利用FRET技术实时定量测定PKA的含量,探讨GC怎样通过第二信使PKA信号通路在胰岛β细胞胰岛素分泌中发挥作用,从而进一步补充关于2型糖尿病的发病机制研究中的欠缺,并为新的糖尿病靶向治疗药物的研发提供实验室方面的依据。

[0004] 其具体技术方案为:

[0005] 一种AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的方法,包括以下步骤:

[0006] 步骤1、细胞培养

[0007] 用含15%胎牛血清(FBS)、4.5g/L葡萄糖、2%青链霉素、1%L-谷氨酰胺及1%β-巯基乙醇的DMEM培养基,在37℃含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,传代至4~15代用于实验。

[0008] 步骤2、分组

[0009] 将MIN6细胞以 $4 \times 10^5$ /孔于6孔培养板中培养,在对数生长期用于实验。一组用于ELISA检测MIN6胞内未添加ISO胰岛素释放量,一组用于ELISA检测MIN6胞内添加ISO胰岛素释放量,细胞分为3部分后分别在无糖、低糖、高糖环境下培养,之后给予不同浓度的G1g(0、500、1000ng/L)干预处理;一组用于FRET技术检测PKA水平。

[0010] 步骤3、方法

[0011] 3.1基于FRET技术在不同浓度葡萄糖和GC干预下实时定量检测PKA;

[0012] 3.2ELISA法检测各组MIN6细胞胰岛素的释放量;

[0013] 3.2.1采集MIN6细胞胰岛素样品;

[0014] (1) MIN6细胞传代于5个6孔培养板,待其贴壁稳定,状态良好;

[0015] (2) 小心吸出培养基,换入含2%FBS(其它成分及比例相同)的培养基,继续在37℃环境下培养;

[0016] (3) 培养约12h后吸出原有培养基,用Krebs液轻轻冲洗1次,在每孔培养皿加入1ml Krebs液,在37℃环境下孵育2h;

[0017] (4) 吸出原有Krebs液,向各孔培养皿中分别加入处理液1ml,空白对照组直接加入

1ml

[0018] Kerbs,37℃培养箱孵育1h;

[0019] (5) 分别吸取每孔的细胞上清液,移入1.5ml离心管,做好标记后剪取封口膜密封,保存于-20℃冰箱待测;

[0020] 3.2.2测定MIN6细胞上清中胰岛素

[0021] (1)准备试剂盒:

[0022] (2)检测程序:

[0023] (3)结果计算与判断:

[0024] ①以4000pg/ml、2000pg/ml、1000pg/ml、500pg/ml、250pg/ml、125pg/ml、62.5pg/ml、

[0025] 0pg/ml等浓度的标准品为横坐标,以相对应的OD值为纵坐标,画出标准曲线图;

[0026] ②根据测得的细胞上清液样品OD值,在标准曲线上计算出相应胰岛素含量,乘上稀释倍数后得出样品内胰岛素含量。

[0027] 步骤4、统计学方法

[0028] 采用SPSS17.0统计软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析,采用双侧检验,P<0.05认为差异具有统计学意义。

[0029] 优选地,步骤3.1具体为:

[0030] (1) 在荧光显微镜下观察转染48h后的MIN6细胞,其荧光蛋白表达良好,转染效率约80%-90%;

[0031] (2) 小心吸出原有培养基,Krebs液冲洗2遍;

[0032] (3) 每个培养皿中加入0.5ml Krebs液,放回培养箱;

[0033] (4) 任取一个培养皿,放在激光共聚焦显微镜下,定位单个细胞后换用油镜观察;

[0034] (5) 在激光共聚焦计算机软件上设置好激发波长和发射波长范围,开始采集图像;

[0035] (6) 各培养皿根据实验分组依次加入药物;

[0036] (7) 以时间为横坐标、CFP/YFP比值为纵坐标画图。

[0037] 进一步,所述准备试剂盒具体为:

[0038] ①打开10×标本稀释液母液包装,按照10×标本稀释液:双蒸水=1:10的比例,加入双蒸水稀释标本稀释液;

[0039] ②标准品液的配制:打开标准品液包装,用微量移液枪加入500μl双蒸水混匀,将其配制成40ng/ml的溶液。准备8个干净的离心管,分别标记1-8,向管1中加入900μl标本稀释液,管2至管8中各加入500μl标本稀释液。向管1中加入100μl 40ng/ml的标准品溶液混匀,用微量移液枪从其中吸出500μl移至管2,如此反复操作,将各管溶液进行稀释,最后从管7中吸出500μl弃去,管8作为空白对照;

[0040] ③按照洗涤液母液液:双蒸水=1:10的比例,稀释洗涤液;

[0041] ④按照标本:双蒸水=1:20的比例,稀释收集到的细胞上清液标本。

[0042] 进一步,所述检测程序具体为:

[0043] ①分别吸取100μl的标准品,加入每个反应孔中,充分混匀,在37℃环境下静置40min;

[0044] ②用稀释好的洗涤液充分洗涤反应板约5次,用滤纸将反应板上的水分吸干;

- [0045] ③除空白组以外,向每个反应孔各加50 $\mu$ l双蒸水和第一抗体工作液,充分混匀,在37℃
- [0046] 环境下静置20min;
- [0047] ④用稀释好的洗涤液充分洗涤反应板约5次,用滤纸将反应板上的水分吸干;
- [0048] ⑤分别吸取100 $\mu$ l的酶标抗体工作液,加入到每个反应孔中,充分混匀,在37℃环境下静置10min;
- [0049] ⑥用稀释好的洗涤液充分洗涤反应板约5次,用滤纸将反应板上的水分吸干;
- [0050] ⑦分别吸取100 $\mu$ l的底物工作液,加入到每个反应孔中,充分混匀,放在37℃环境下避光反应15min;
- [0051] ⑧分别吸取100 $\mu$ l的终止液,加入每个反应孔中,充分混匀;
- [0052] ⑨用Bio-RAD酶标仪在450nm处测OD值,此操作必须在30min内完成。
- [0053] ⑩同样的方法检测待测样品。
- [0054] 本发明所述AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的方法在糖尿病靶向治疗药物制备过程中的应用。
- [0055] 与现有技术相比,本发明的有益效果:
- [0056] 本发明在不同浓度葡萄糖环境下,设置不同浓度水平的GC干预,通过刺激PKA信号通路,并且在添加刺激剂ISO前后,利用FRET技术实时定量测定PKA的含量,探讨GC怎样通过第二信使PKA信号通路在胰岛β细胞胰岛素分泌中发挥作用,从而进一步补充关于2型糖尿病的发病机制研究中的欠缺,并为新的糖尿病靶向治疗药物的研发提供实验室方面的依据。

## 附图说明

- [0057] 图1无葡萄糖低GC组MIN6细胞内PKA的检测,将转染AKR 48h后的MIN6细胞换液,加入0.5ml Krebs液,放在激光共聚焦显微镜下,定位单个细胞视野后换用油镜观察,设置激发波长和发射波长范围,扫描时间设置为25s/次,开始图像采集,扫描至75s,此为空白处理阶段,加0.5ml krebs液于培养皿中,保持葡萄糖浓度为0mmol/L,扫描至385s,此为0ng/L GC阶段,等同于空白处理阶段,加入0.5ml终浓度为500ng/L的GC液,扫描至745s,此为500ng/L GC阶段,加入刺激剂ISO,约至1010s停止扫描,其中,A、B、C分别为CFP、YFP、FRET现象的荧光图像,D为CFP、YFP、FRET的重叠图像,E为动态FRET现象的扫描截图;
- [0058] 图2无葡萄糖低GC组MIN6细胞CFP/YFP的变化情况,与空白处理阶段相比,#P<0.05;与500ng/L GC阶段相比,\*P<0.05。
- [0059] 图3无葡萄糖高GC组MIN6细胞内PKA的检测,将转染AKR 48h后的MIN6细胞换液,加入0.5ml Krebs液,放在激光共聚焦显微镜下,定位单个细胞视野后换用油镜观察,设置激发波长和发射波长范围,扫描时间设置为25s/次,开始图像采集,扫描至75s,此为空白处理阶段,加0.5ml krebs液于培养皿中,保持葡萄糖浓度为0mmol/L,扫描至385s,此为0ng/L GC阶段,等同于空白处理阶段,加入0.5ml终浓度为1000ng/L的GC液,扫描至745s,此为1000ng/L GC阶段,加入刺激剂ISO,约至1010s停止扫描,其中,A、B、C分别为CFP、YFP、FRET现象的荧光图像,D为CFP、YFP、FRET的重叠图像,E为动态FRET现象的扫描截图;
- [0060] 图4是无葡萄糖高GC组MIN6细胞CFP/YFP的变化情况,与空白处理阶段相比,#P<

0.05;与1000ng/L GC阶段相比,\*P<0.05。

[0061] 图5低葡萄糖低GC组MIN6细胞内PKA的检测,将转染AKR 48h后的MIN6细胞换液,加入0.5ml Krebs液,放在激光共聚焦显微镜下,定为单个细胞后换用油镜观察,设置激发波长和发射波长范围,扫描时间设置为25s/次,开始图像采集,扫描至75s,此为空白处理阶段,加入0.5ml终浓度为2.8mmol/L的葡萄糖于培养皿中,保持葡萄糖浓度为2.8mmol/L,扫描至385s,此为0ng/L GC阶段,加入0.5ml终浓度为500ng/L的GC液,扫描至745s,此为500ng/L GC阶段,加入刺激剂ISO,约至1010s停止扫描,其中,A、B、C分别为CFP、YFP、FRET现象的荧光图像,D为CFP、YFP、FRET的重叠图像,E为动态FRET现象的扫描截图;

[0062] 图6低葡萄糖低GC组MIN6细胞CFP/YFP的变化情况,与空白处理阶段相比,#P<0.05;与0ng/L GC阶段相比,\*P<0.05;与500ng/L GC阶段相比,△P<0.05。

[0063] 图7低葡萄糖高GC组MIN6细胞内PKA的检测,将转染AKR 48h后的MIN6细胞换液,加入0.5ml Krebs液,放在激光共聚焦显微镜下,定位单个细胞视野后换用油镜观察,设置激发波长和发射波长范围,扫描时间设置为25s/次,开始图像采集,扫描至75s,此为空白处理阶段,加入0.5ml终浓度为2.8mmol/L的葡萄糖于培养皿中,保持葡萄糖浓度为2.8mmol/L,扫描至385s,此为0ng/L GC阶段,加入0.5ml终浓度为1000ng/L的GC液,扫描至745s,此为1000ng/L GC阶段,加入刺激剂ISO,约至1010s停止扫描,约至1010s停止扫描,其中,A、B、C分别为CFP、YFP、FRET现象的荧光图像,D为CFP、YFP、FRET的重叠图像,E为动态FRET现象的扫描截图;

[0064] 图8低葡萄糖高GC组MIN6细胞CFP/YFP的变化情况,与空白处理阶段相比,#P<0.05;与0ng/L GC阶段相比,\*P<0.05;与1000ng/L GC阶段相比,△P<0.05。

[0065] 图9高葡萄糖低GC组MIN6细胞内PKA的检测,将转染AKR 48h后的MIN6细胞换液,加入0.5ml Krebs液,放在激光共聚焦显微镜下,定位单个细胞视野后换用油镜观察,设置激发波长和发射波长范围,扫描时间设置为25s/次,开始图像采集,扫描至75s,此为空白处理阶段,加入0.5ml终浓度为16.7mmol/L的葡萄糖于培养皿中,保持葡萄糖浓度为16.7mmol/L,扫描至385s,此为0ng/L GC阶段,加入0.5ml终浓度为500ng/L的GC液,扫描至745s,此为500ng/L GC阶段,加入刺激剂ISO,约至1010s停止扫描,约至1010s停止扫描,其中,A、B、C分别为CFP、YFP、FRET现象的荧光图像,D为CFP、YFP、FRET的重叠图像,E为动态FRET现象的扫描截图;

[0066] 图10高葡萄糖低GC组MIN6细胞CFP/YFP的变化情况,注:与空白处理阶段相比,#P<0.05;与0ng/L GC阶段相比,\*P<0.05;与500ng/L GC阶段相比,△P<0.05。

[0067] 图11高葡萄糖高GC组MIN6细胞内PKA的检测,将转染AKR 48h后的MIN6细胞换液,加入0.5ml Krebs液,放在激光共聚焦显微镜下,定位单个细胞视野后换用油镜观察,设置激发波长和发射波长范围,扫描时间设置为25s/次,开始图像采集,扫描至75s,此为空白处理阶段,加入0.5ml终浓度为16.7mmol/L的葡萄糖于培养皿中,保持葡萄糖浓度为16.7mmol/L,扫描至385s,此为0ng/L GC阶段,加入0.5ml终浓度为1000ng/L的GC液,扫描至745s,此为1000ng/L GC阶段,加入刺激剂ISO,约至1010s停止扫描,约至1010s停止扫描,其中,A、B、C分别为CFP、YFP、FRET现象的荧光图像,D为CFP、YFP、FRET的重叠图像,E为动态FRET现象的扫描截图;

[0068] 图12高葡萄糖高GC组MIN6细胞CFP/YFP的变化情况,注:与空白处理阶段相比,#P<

0.05;与0ng/L GC阶段相比,\*P<0.05;与1000ng/L GC阶段相比,△P<0.05。

[0069] 图13不同浓度GC对PKA生成影响的比较,“-”表示没有添加ISO,“+”表示添加ISO;与500ng/L GC相比,#P<0.05;与500ng/L GC ISO+相比,\*P<0.05。

[0070] 图14无ISO时不同处理组胰岛素分泌量的比较,与同组0ng/L GC水平相比,#P<0.05;与同组500ng/L GC水平相比,\*P<0.05。

[0071] 图15添加ISO时不同处理组胰岛素分泌量的比较,与同组0ng/L GC水平相比,#P<0.05;与同组500ng/L GC水平相比,\*P<0.05。

[0072] 图16添加ISO前后不同处理组△胰岛素分泌量的比较,△胰岛素分泌量为添加刺激剂ISO前后胰岛素分泌量的增加量;与0ng/L GC水平相比,#P<0.05;与500ng/L GC水平相比,\*P<0.05。

## 具体实施方式

[0073] 下面结合附图和具体实施方案对本发明的技术方案作进一步详细地说明。

[0074] 1. 实验材料

[0075] 胰岛β细胞系MIN6细胞、PCDNA3.1和AKR质粒。主要试剂:盐酸异丙肾上腺素(ISO)、0.25%含EDTA-胰蛋白酶液、DMEM培养基、小鼠INS-ELISA试剂盒、cAMP-ELISA试剂盒、质粒大提试剂盒等。

[0076] 2. 细胞培养

[0077] 用含15%胎牛血清(FBS)、4.5g/L葡萄糖、2%青链霉素、1%L-谷氨酰胺及1%β-巯基乙醇的DMEM培养基,在37℃含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,传代至4~15代用于实验。

[0078] 3. 分组

[0079] 将MIN6细胞以4×10<sup>5</sup>/孔于6孔培养板中培养,在对数生长期用于实验。一组用于ELISA检测MIN6胞内未添加ISO胰岛素释放量,一组用于ELISA检测MIN6胞内添加ISO胰岛素释放量,细胞分为3部分后分别在无糖、低糖、高糖环境下培养,之后给予不同浓度的G1g(0、500、1000ng/L)干预处理;一组用于FRET技术检测PKA水平,分组设置如下(表1、2、3)。

[0080] 表1基于FRET技术实时测定PKA水平的分组情况

[0081]

分组类别	葡萄糖浓度	转染质粒种类	胰高血糖素	ISO
处理组	A (无糖)	AKR	低 GC	-
	B (无糖)	AKR	高 GC	+
	C (低糖)	AKR	低 GC	-
	D (低糖)	AKR	高 GC	+
	E (高糖)	AKR	低 GC	-
	F (高糖)	AKR	高 GC	+
对照组	G (高糖)	PCDNA3.1	高 GC	+

[0082] 注:“-”表示没有添加ISO,“+”表示添加ISO

[0083] 表2没有添加ISO时在MIN6细胞内检测胰岛素释放量的分组

葡萄糖浓 (mmol/L)	胰高血糖素浓度 (ng/L)		
	0 (无 GC)	500 (低 GC)	1000(高 GC)
0 (无糖 1 组)	(1)	(2)	(3)
2.8 (低糖 1 组)	(4)	(5)	(6)
16.7 (高糖 1 组)	(7)	(8)	(9)

[0085] 表3添加ISO后在MIN6细胞内检测胰岛素释放量的分组

葡萄糖浓 (mmol/L)	胰高血糖素浓度 (ng/L)		
	0 (无 GC)	500 (低 GC)	1000(高 GC)
0 (无糖 2 组)	①	②	③
2.8 (低糖 2 组)	④	⑤	⑥
16.7 (高糖 2 组)	⑦	⑧	⑨

#### [0087] 4、统计学方法

[0088] 采用SPSS17.0统计软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析,采用双侧检验,P<0.05认为差异具有统计学意义。

[0089] 实施例1. 基于FRET技术在MIN6细胞中实时定量检测不同浓度葡萄糖环境下不同浓度GC水平对PKA含量的影响

[0090] 各组A、B、C分别为CFP、YFP、FRET现象的荧光图像,D为CFP、YFP、FRET的重叠图像,E为动态FRET现象的扫描截图。

[0091] 1.1无葡萄糖低GC组MIN6细胞内PKA的检测

[0092] 结果显示:无糖环境下,加入500ng/L GC后与空白处理阶段相比,CFP/YFP比值上升(P<0.05),加入ISO刺激后,CFP/YFP比值较空白处理阶段和500ng/L GC阶段均上升(P<0.05) (图2)。

[0093] 1.2无葡萄糖高GC组MIN6细胞内PKA的检测

[0094] 结果显示:无糖环境下,加入1000ng/L GC刺激后与空白处理阶段相比,CFP/YFP比值上升(P<0.05),加入ISO刺激后,CFP/YFP比值较空白处理阶段和1000ng/L GC阶段均上升(P<0.05) (图4)。

[0095] 1.3低葡萄糖低GC组MIN6细胞内PKA的检测

[0096] 结果显示:低糖环境下,加入低糖刺激后与空白处理阶段相比,CFP/YFP比值上升(P<0.05),加入500ng/L GC刺激后与空白处理阶段和0ng/L GC阶段相比,CFP/YFP比值上升(P<0.05),加入ISO刺激后,CFP/YFP比值较空白处理阶段、0ng/L GC阶段和500ng/L GC阶段均明显上升(P<0.05) (图6)。

[0097] 1.4低葡萄糖高GC组MIN6细胞内PKA的检测

[0098] 结果显示:低糖环境下,加入低糖刺激后与空白处理阶段相比,CFP/YFP比值上升( $P<0.05$ ) ,加入1000ng/L GC刺激后与空白处理阶段和0ng/L GC阶段相比,CFP/YFP比值上升( $P<0.05$ ) ;加入ISO刺激后,CFP/YFP比值较空白处理阶段、0ng/L GC阶段和1000ng/L GC阶段均明显上升( $P<0.05$ ) (图8)。

[0099] 1.5高葡萄糖低GC组MIN6细胞内PKA的检测

[0100] 结果显示:高糖环境下,加入高糖刺激后与空白处理阶段相比,CFP/YFP比值上升( $P<0.05$ ) ,加入500ng/L GC刺激后与空白处理阶段和0ng/L GC阶段相比,CFP/YFP比值上升( $P<0.05$ ) ;加入ISO刺激后,CFP/YFP比值较空白处理阶段、0ng/L GC阶段和500ng/L GC阶段均明显上升( $P<0.05$ ) (图10)。

[0101] 1.6高葡萄糖高GC组MIN6细胞内PKA含量检测

[0102] 结果显示:高糖环境下,加入高糖刺激后与空白处理阶段相比,CFP/YFP比值上升( $P<0.05$ ) ,加入1000ng/L GC刺激后与空白处理阶段和0ng/L GC阶段相比,CFP/YFP比值上升( $P<0.05$ ) ;加入ISO刺激后,CFP/YFP比值较空白处理阶段、0ng/L GC阶段和1000ng/L GC阶段均明显上升( $P<0.05$ ) (图12)。

[0103] 1.7不同葡萄糖浓度下不同水平GC干预对PKA生成影响的比较

[0104] 在0mmol/L浓度环境下,500ng/L GC阶段CFP/YFP比值上升9.73%,1000ng/L GC阶段上升10.26%,两个干预阶段之间无差异( $P$ 均>0.05),在添加刺激剂ISO后500ng/L GC阶段CFP/YFP比值上升34.36%,1000ng/L GC阶段上升34.28%,两个阶段之间仍无差异( $P$ 均>0.05);在2.8mmol/L浓度环境下,500ng/L GC阶段CFP/YFP比值上升17.04%,1000ng/L GC阶段上升26.12%,1000ng/L GC阶段上升率高于500ng/L GC阶段( $P<0.05$ ),加入刺激剂后500ng/L GC阶段CFP/YFP比值上升52.59%,1000ng/L GC阶段上升69.31%,1000ng/L GC阶段上升率高于500ng/L GC阶段( $P<0.05$ );在16.7mmol/L浓度环境下,500ng/L GC阶段CFP/YFP比值上升42.53%,1000ng/L GC阶段上升23%,1000ng/L GC阶段上升率高于500ng/L GC阶段( $P<0.05$ ),加入刺激剂后500ng/L GC阶段CFP/YFP比值上升75.37%,1000ng/L GC阶段上升104.59%,1000ng/L GC阶段上高于500ng/L GC阶段( $P<0.05$ ) (图13)。

[0105] 2.ELISA法检测不同浓度GC对各组MIN6细胞胰岛素分泌量的影响

[0106] 2.1在没有添加刺激剂ISO的情况下检测胰岛素分泌量

[0107] 无糖1组中,500ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于0ng/L GC时( $P<0.05$ ),1000ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于500ng/L GC和0ng/L GC时( $P<0.05$ );低糖1组,500ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于0ng/L GC时( $P<0.05$ ),1000ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于500ng/L GC和0ng/L GC时( $P<0.05$ );高糖1组,500ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于0ng/L GC时( $P<0.05$ ),1000ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于500ng/L GC和0ng/L GC时( $P<0.05$ ) (图14)。

[0108] 2.2在添加刺激剂ISO的情况下检测胰岛素分泌量

[0109] 结果显示:无糖2组,500ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于0ng/L GC时( $P<0.05$ ),1000ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于500ng/L GC和0ng/L GC时( $P<0.05$ );低糖2组,500ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于0ng/L GC时( $P<0.05$ ),1000ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于500ng/L GC和0ng/L GC时( $P<0.05$ );高糖2组,500ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于0ng/L GC时( $P<0.05$ ),1000ng/L GC干预后胰岛素分泌量高于500ng/L GC和0ng/L GC时( $P<0.05$ ) (图15)。

[0110] 2.3添加刺激剂ISO前后胰岛素分泌量的比较

[0111] 无糖环境下,500ng/L GC干预后与0ng/L GC干预后无差异 ( $P>0.05$ ) ,1000ng/L GC干预后与500ng/L GC干预后无差异 ( $P>0.05$ ) ,1000ng/L GC干预后与0ng/L GC干预后有差异,且1000ng/L GC干预后胰岛素分泌量的增加量高于0ng/L GC时 ( $P<0.05$ ) ;低糖环境下,500ng/L GC干预后与0ng/L GC干预后有差异,且500ng/L GC干预后胰岛素分泌量的增加量高于0ng/L GC时 ( $P<0.05$ ) ,1000ng/L GC干预后与500ng/L GC干预后无差异 ( $P>0.05$ ) ,1000ng/L GC干预后与0ng/L GC干预后有差异,且1000ng/L GC干预后胰岛素分泌量的增加量高于0ng/L GC时 ( $P<0.05$ ) ;高糖环境下,500ng/L GC干预后与0ng/L GC干预后有差异,且500ng/L GC干预后胰岛素分泌量的增加量高于0ng/L GC时 ( $P<0.05$ ) ,1000ng/L GC干预后与500ng/L GC干预后和0ng/L GC干预后均有差异,且1000ng/L GC干预后胰岛素分泌量的增加量高于500ng/L GC和0ng/L GC时 ( $P<0.05$ ) (图16)。

[0112] 结论

[0113] 1.GC以浓度梯度的形式,通过增加MIN6细胞内PKA的浓度来促进胰岛素的分泌;

[0114] 2.添加刺激剂ISO后GC增加PKA及胰岛素分泌的作用更加明显,说明GC促进胰岛素分泌的作用通过第二信使信号系统PKA通路途径实现;

[0115] 3.GC通过增加PKA的浓度促进胰岛素分泌的作用具有一定的葡萄糖依赖性。

[0116] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,本发明的保护范围不限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,可显而易见地得到的技术方案的简单变化或等效替换均落入本发明的保护范围内。

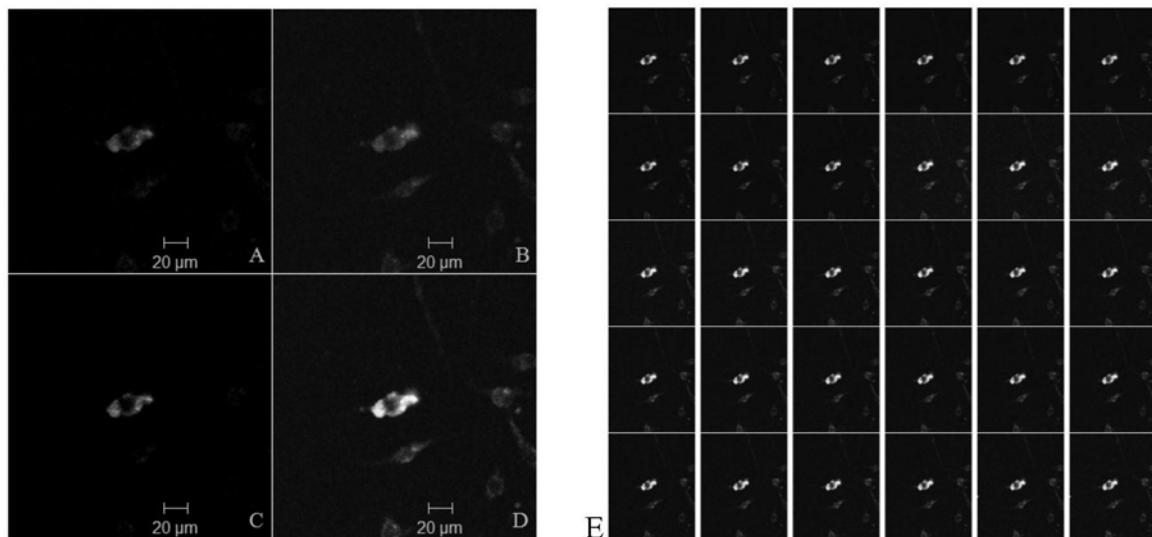


图1

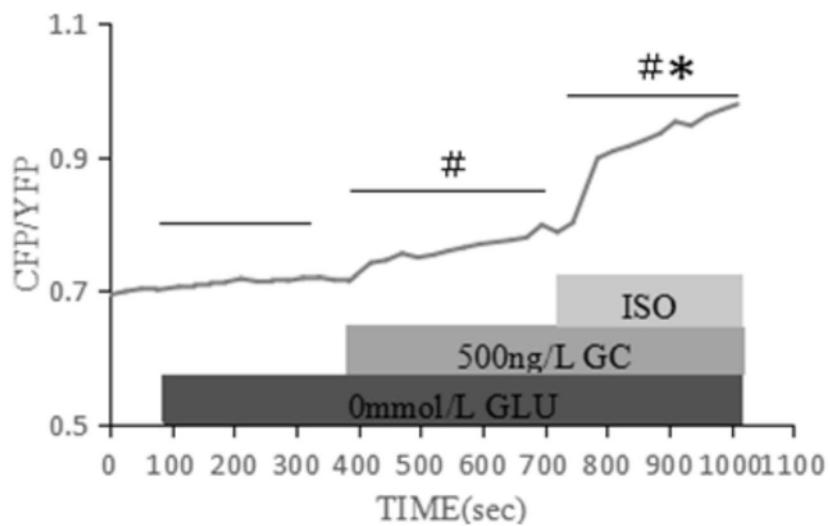


图2

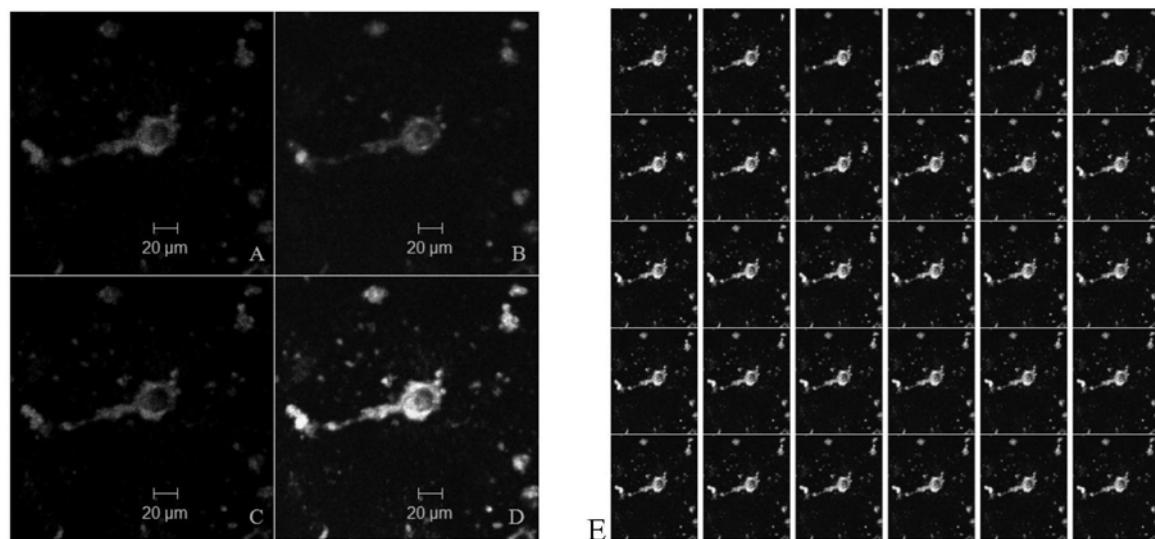


图3

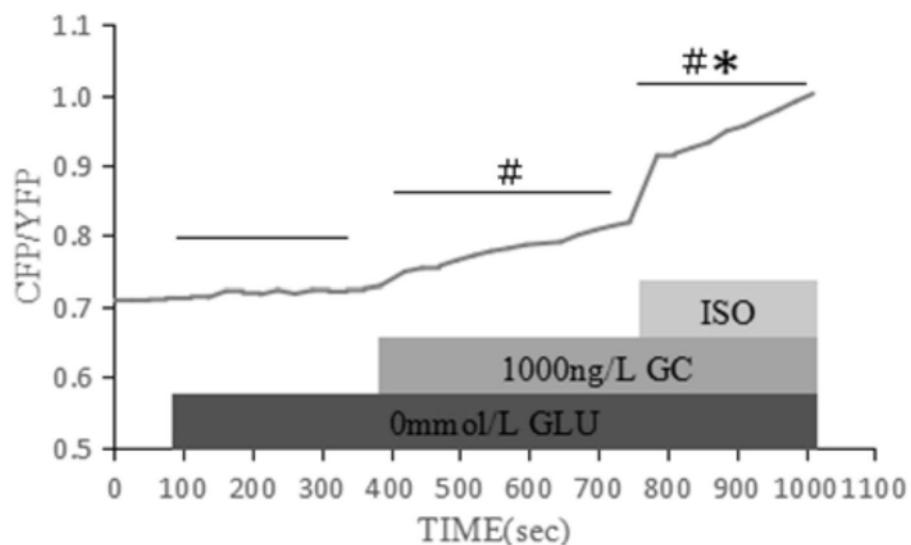


图4

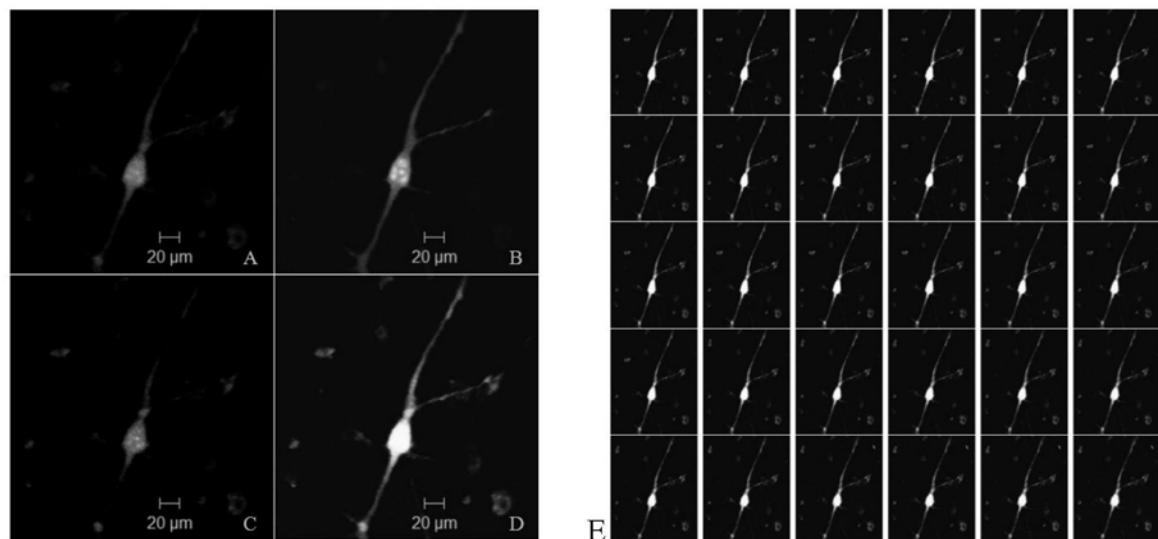


图5

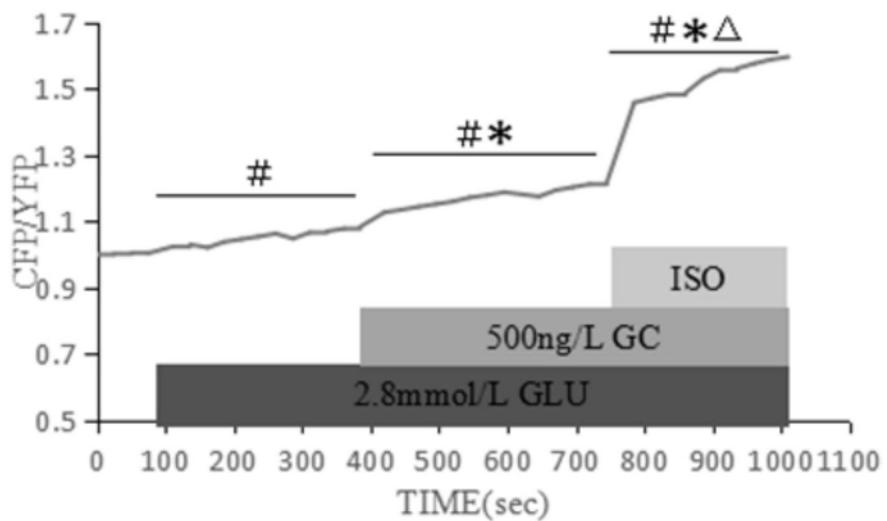


图6

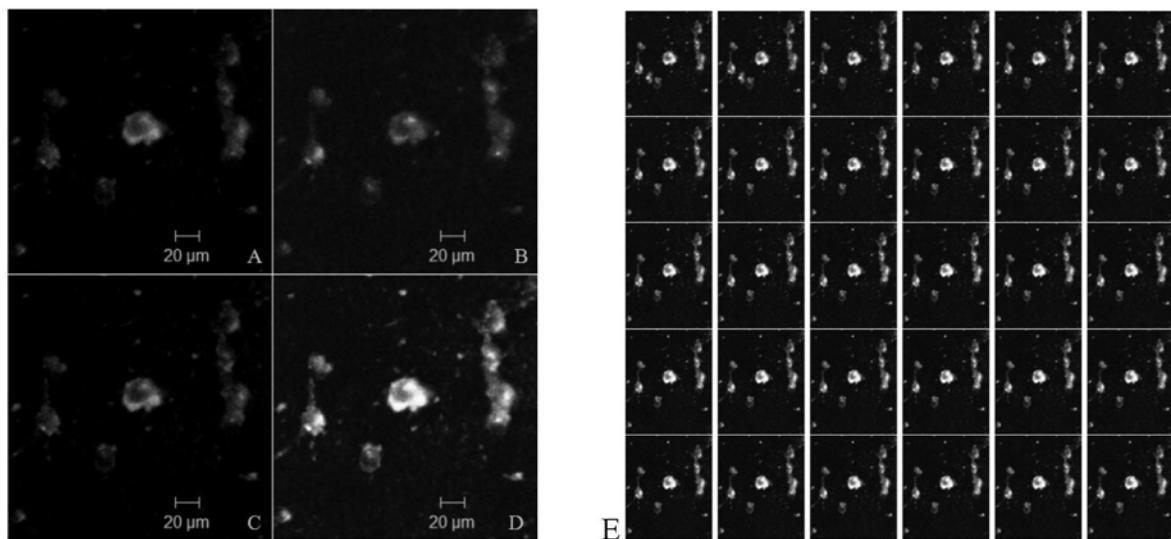


图7

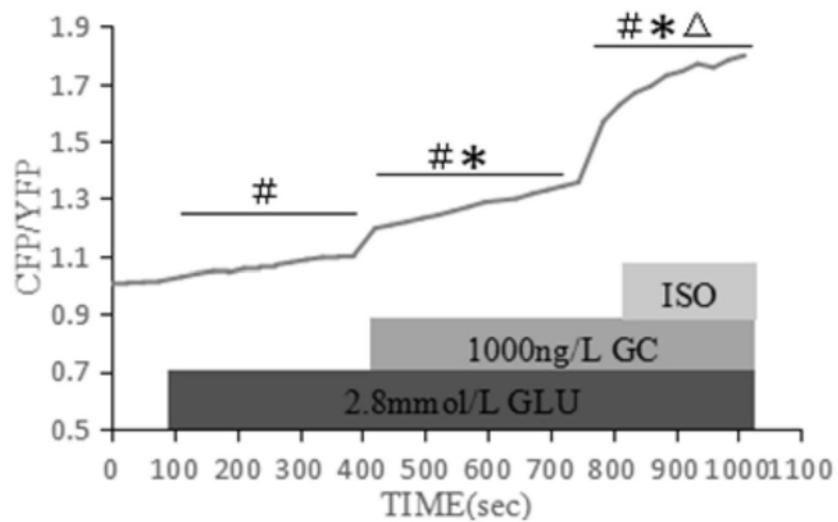


图8

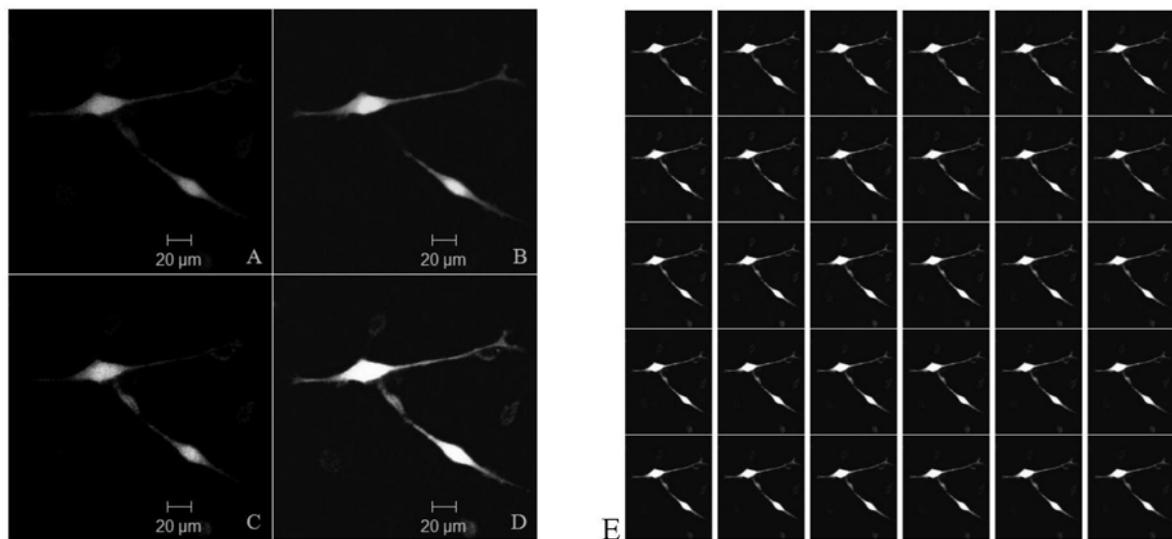


图9

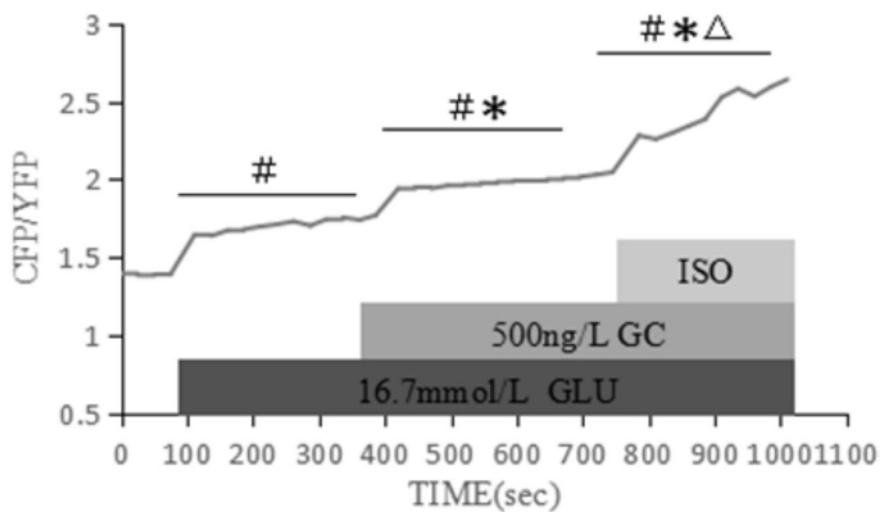


图10

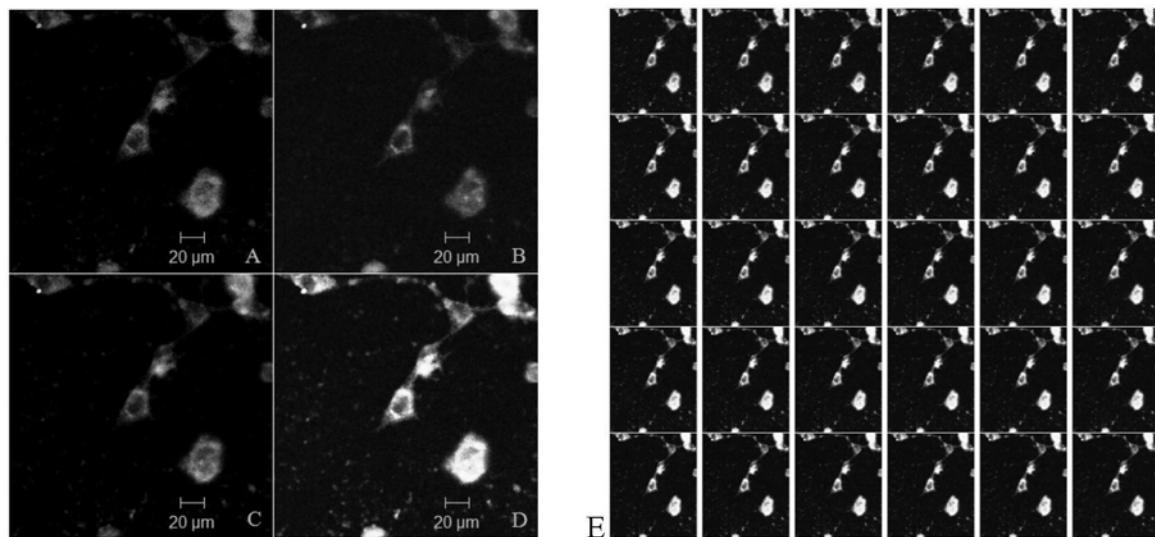


图11

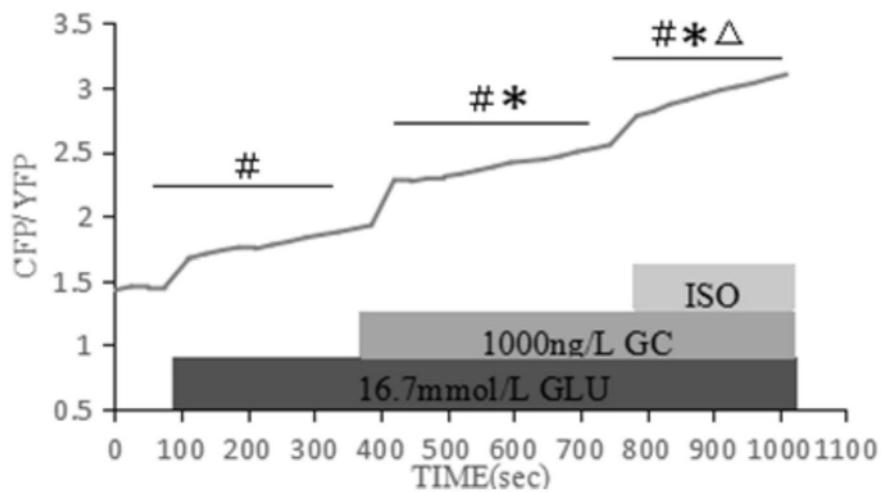


图12

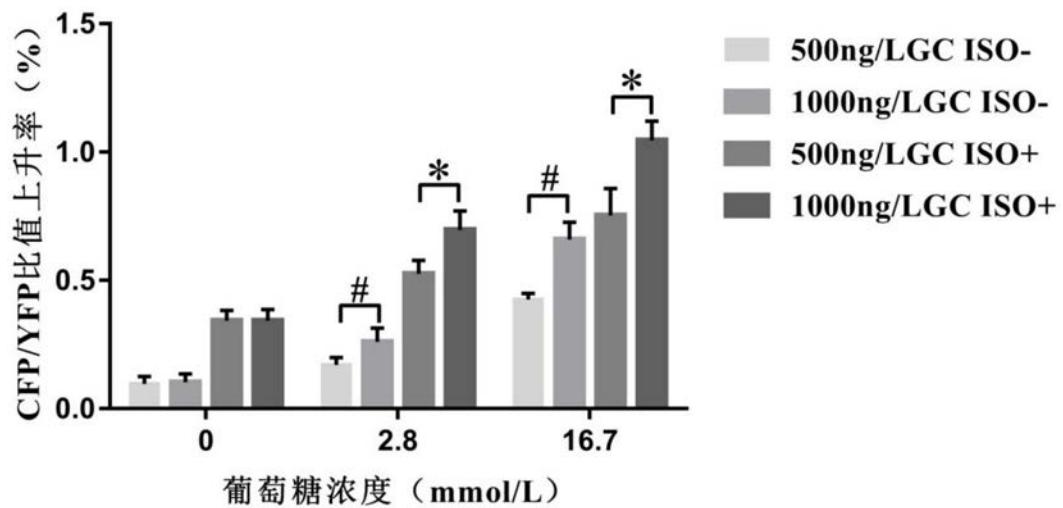


图13

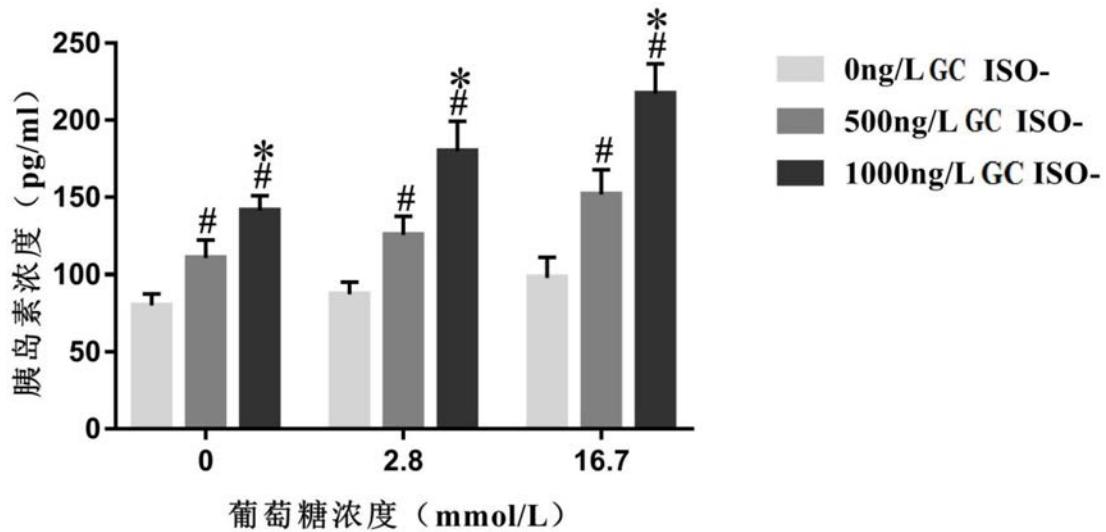


图14

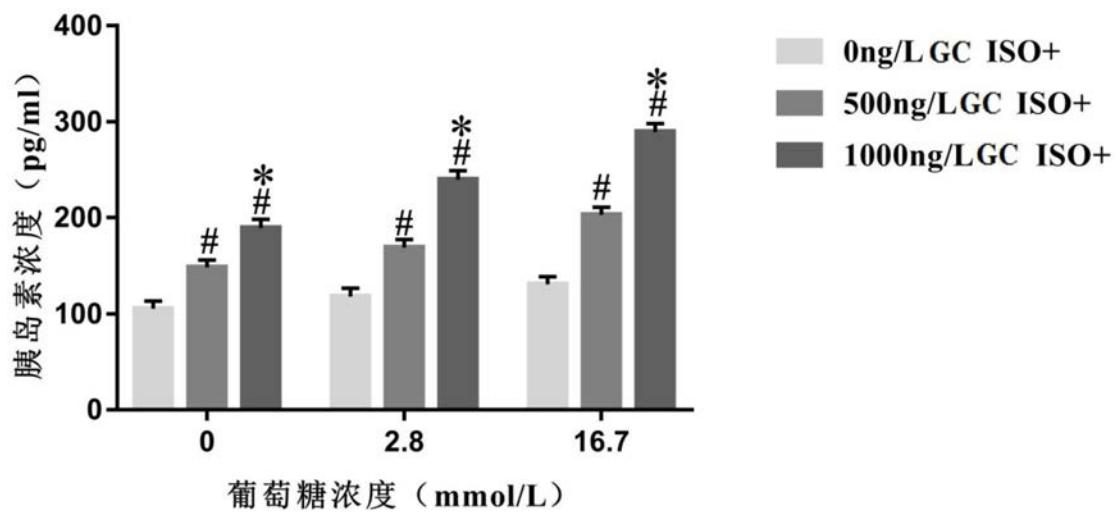


图15

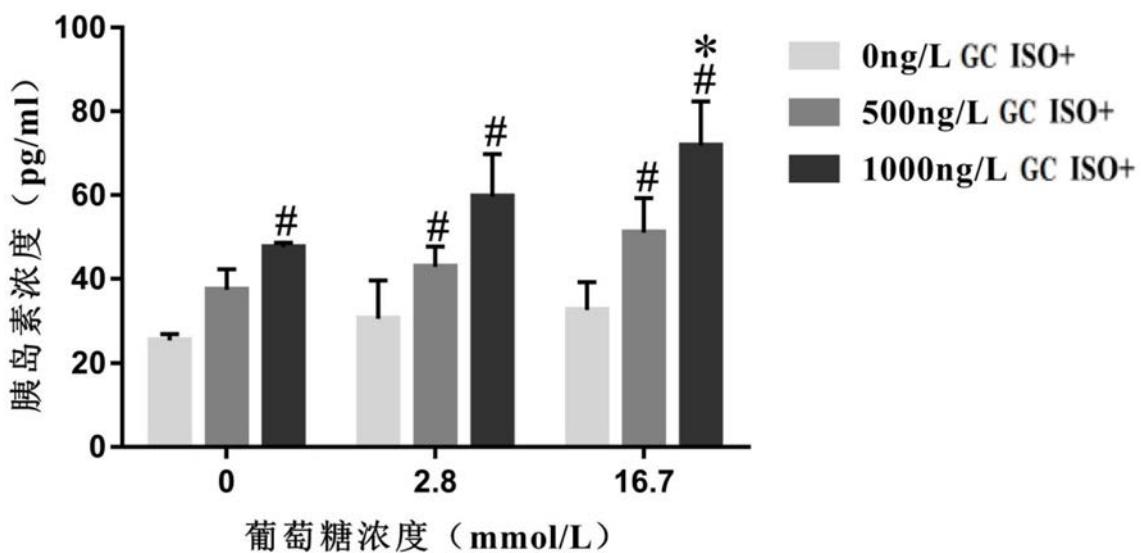


图16

专利名称(译)	AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109406769A</a>	公开(公告)日	2019-03-01
申请号	CN201811142521.5	申请日	2018-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	李军		
申请(专利权)人(译)	李军		
当前申请(专利权)人(译)	李军		
[标]发明人	李军 李思源 张君 李含晖 尹亮 火睿 李佳佳 胡颖 王双 石艳秋 胡倩		
发明人	李军 李思源 张君 李含晖 尹亮 火睿 李佳佳 胡颖 王双 石艳秋 胡倩		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/68 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/535 G01N21/6428 G01N33/6863		
代理人(译)	董芙蓉		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明公开了一种AKR在MIN6细胞中胰岛素分泌机制研究的应用，在不同浓度葡萄糖环境下，设置不同浓度水平的GC干预，通过刺激PKA信号通路，并且在添加刺激剂ISO前后，利用FRET技术实时定量测定PKA的含量，探讨GC怎样通过第二信使PKA信号通路在胰岛β细胞胰岛素分泌中发挥作用，从而进一步补充我们前期关于2型糖尿病的发病机制研究中的欠缺，并为新的糖尿病靶向治疗药物的研发提供实验室方面的依据。

