

[药 理]

番石榴叶总三萜改善糖尿病周围神经病变

叶开和¹, 王小康¹, 吕艳青¹, 魏崧丞¹, 李秀存¹, 张晓琦², 叶春玲^{1*}

(1. 暨南大学药学院药理学教研室, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632)

摘要: **目的** 观察番石榴叶总三萜 (TTPGL) 对糖尿病大鼠周围神经病变 (DPN) 的改善作用, 并探讨其作用机制。**方法** 采用高脂饮食加腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 建立糖尿病大鼠模型。将糖尿病大鼠随机分为 6 组, 石榴叶总三萜低、中、高剂量组 [30、60、120 mg/(kg·d)], 正常组, 模型组和罗格列酮组。测定坐骨神经运动传导速度 (MCV) 并对组织 HE 染色; 利用 RT-PCR 检测坐骨神经组织肿瘤坏死因子- α (*Tnfa*), 白细胞介素-6 (*Il6*) 和一氧化氮合酶 (*iNOS*) mRNA 的表达量; 印迹法检测蛋白激酶 B (AKT)、核转录因子 κ B 激酶抑制因子 IKK α 、p65 及其各自磷酸化蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 石榴叶总三萜 (120 mg/kg) 组显著地改善了坐骨神经的神经病变 ($P < 0.05$); 石榴叶总三萜显著性抑制各炎症因子 mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 并显著下调 p-AKT/AKT、p-IKK α /IKK α 、p-p65/p65 的表达 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论** 石榴叶总三萜具有显著改善 DPN 的作用, 其机制可能通过下调 NF- κ B 介导的信号通路, 从而减少炎症介质产生。

关键词: 番石榴叶总三萜; 糖尿病周围神经病变; 炎症介质; NF- κ B 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)05-0961-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.05.001

Ameliorative effect of total triterpenoids from *Psidium guajava* leaves on diabetic peripheral neuropathy

YE Kai-he¹, WANG Xiao-kang¹, LÜ Yan-qing¹, WEI Song-cheng¹, LI Xiu-cun¹, ZHANG Xiao-qi², YE Chun-ling^{1*}

(1. Department of Pharmacology, Pharmacy College of Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the ameliorative effect of total triterpenoids from *Psidium guajava* leaves (TTPGL) on diabetic peripheral neuropathy (DPN) in rats and to explore the underlying mechanism. **METHODS** Rats models for diabetic were induced by high-fat feeding and STZ injection. These rats were randomized into six groups, TTPGL-30, 60 and 120 groups [30, 60 and 120 mg/(kg·d)], control group, model group and positive control rosiglitazone group [3 mg/(kg·d)]. Nerve conduction velocity (MCV) and histopathological staining were performed on sciatic nerves. mRNA expressions of pro-inflammatory molecules (*Tnfa*, *Il6* and *iNOS*) and tissue proteins (AKT, IKK α and p65) were also estimated by RT-PCR and Western blot, respectively. **RESULTS** Compared with the model group, TTPGL (120 mg/kg) group significantly ameliorated DPN nerve deficits ($P < 0.05$). It significantly inhibited *Tnfa*, *Il6* and *iNOS* mRNA expressions ($P < 0.05$), and significantly down-regulated p-AKT/AKT, p-IKK α /IKK α and p-p65/p65 ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **CONCLUSION** TTPGL can markedly improve DPN symptom, whose mechanism may be related to the down-regulation of NF- κ B-mediated signal pathway, and then decrease the expressions of inflammatory mediators.

收稿日期: 2015-10-29

基金项目: 广东省高等学校科技创新重点项目 (cxzd1111); 国家自然科学基金(81373935); 广东省重大科技专项(2013A022100028)

作者简介: 叶开和 (1970—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为内分泌药理学。Tel: (020) 85220261, E-mail: rightye33@163.com

* 通信作者: 叶春玲 (1963—), 女, 博士, 教授, 从事神经内分泌方向研究。Tel: (020) 85223843, E-mail: yechunling2005@163.com

KEY WORDS: total triterpenoids from *Psidium guajava* leaves; diabetic peripheral neuropathy; inflammatory mediator; NF- κ B pathway

糖尿病周围神经病变(DPN)是糖尿病最常见的并发症之一^[1]。现如今,炎症对神经退行性变化的研究已为人们熟知,其导致周围神经的损伤性病理生理过程源于炎症介质产生的复杂路径^[2-3]。番石榴叶提取物(主要包含总三萜),作为“消渴降糖胶囊”的原料药,在前期研究中发现其具有一定的抗血糖和肾脏保护作用^[4-5],也有之前的文献报道了其抗炎作用^[6-7]。为进一步探究TTPGL对糖尿病周围神经病变的作用,本实验建立了糖尿病大鼠模型,观察其对糖尿病大鼠周围神经病变的影响并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠,体质量120~130 g,广东省医学实验动物中心提供,许可证号SCXK2012-0002。

1.2 药物与试剂 番石榴叶总三萜(TTPGL)提取自番石榴叶(*Psidium guajava* L.)。番石榴叶产地为广东化州,经《中国植物志》特征对比后确定其种属为桃金娘科番石榴。番石榴叶总三萜经过95%乙醇渗漉提取,过柱,再经过50%、80%和95%乙醇溶液梯度洗脱,浸膏用甲醇溶解,过硅胶柱,氯仿-甲醇梯度洗脱,除色素后经过制备型高效液相(HPLC)反复纯化为淡黄色粉末,溶剂法纯化工艺提取,收率4.0%,由暨南大学天然药物化学研究所提供。高脂饲料:猪油10%,蔗糖15%,蛋黄5%,基础饲料70%,由广东省医学实验动物中心提供;STZ(98%,批号8110047)、罗格列酮(批号13245247)均购于美国Sigma公司;游离脂肪酸(NEFA)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TCH)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;甘油三酯测定试剂盒、总胆固醇测定试剂盒购自温州东瓯津玛生物科技有限公司;多聚甲醛(批号20120522)购自天津市北联精细化学品开发有限公司;Trizol(批号15596-026)购自美国加州Invitrogen Life Technologies公司;DNA引物由美国Invitrogen Biotechnology中国公司合成;逆转录酶RT-PCR试剂盒(批号K1622)购自美国Thermo公司;荧光定量qPCR试剂盒(批号04913914001)购自美国Roche公司; β -Actin antibody、Anti-IKK α antibody、NF- κ B-p65 antibody、Anti-AKT(phospho S473) antibody均购自美国Cell

Signaling Technology公司。

1.3 主要仪器 One touch 稳豪型血糖仪配套试纸(批号PWE005007P,美国强生公司);Model 680酶标仪(美国BIO-RAD公司);低温离心机购自美国Sigma公司;LAC-110.4型电子分析天平购自赛多利斯公司;BL-410生物机能换能系统(成都泰盟科技有限公司研制);光学显微镜(奥林巴斯BX51,日本);WO-9413B型凝胶成像系统,购自北京六一仪器厂;POWER BC 数控电泳仪,购自上海申能博彩生物科技有限公司。

2 方法

2.1 动物建模及分组 雄性SD大鼠90只,分为正常组动物12只和糖尿病建模动物78只,正常组动物给予基础饲料,建模动物给予高脂饲料。喂养4周后,禁食12 h,腹腔注射2% STZ溶液45 mg/kg,1周后测大鼠2 h糖耐量(禁食12 h,灌胃2 g/kg的葡萄糖,测2 h的血糖),筛选血糖值大于11.1 mmol/L的大鼠确定为糖尿病大鼠。模型稳定1周后,将成模的糖尿病大鼠60只按照血糖分层随机分为5组,即番石榴叶总三萜低(30 mg/kg)、中(60 mg/kg)、高(120 mg/kg)剂量组,罗格列酮组(3 mg/kg),模型组,每组各12只。

2.2 给药方式 给药组每天灌胃给予不同剂量的番石榴叶总三萜或罗格列酮,模型组和正常组则灌胃给予同体积的生理盐水,1次/d,连续给药8周。每周末称量大鼠体质量,各组饲料给予同“2.1”项。

2.3 观测指标及方法

2.3.1 血糖血脂测定 给药8周结束后取大鼠血清,按试剂盒说明书进行操作,采用葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖值(FBG),GPO-PAP法测定TG,酶联免疫吸附法测定NEFA、TCH。

2.3.2 坐骨神经运动神经传导速度的测定 采用BL-410生物机能换能系统测定。运动神经传导速度(MCV)测定是在坐骨神经干两个不同端点刺激神经,在其支配肌肉记录运动反应,测定两个刺激点引出的运动反应潜伏期差与通过该两点间的距离之比即为MCV。

2.3.3 炎症介质基因表达测定 取各组大鼠的右腿坐骨神经,研磨组织样品成胶冻状后,用Trizol提取组织的RNA,溶于无核糖核酸酶(RNase)水

中。然后开始在 RT-PCR 仪上进行目的基因 (*Tnfa*, *Il6* 和 *iNOS*) 的定量分析。RT-PCR 仪进行逆转录构建 cDNA 模板, 逆转录反应条件参照试剂盒说明。*Tnfa* 正向引物为 5'-TCAAGGGACAA-3', 反向引物为 5'-GGTATGAAATGGCAAATCGGCT-3', PCR 产物为 80 bp; *Il6* 正向引物为 5'-CCAGGT-TCTCTTTGCTTCTTGGGACTGATGT-3', 反向引物为 5'-TACTGGTCTGTTGTGGGTGGT-3', PCR 产物为 101 bp; *iNOS* 正向引物为 5'-TCAGCA-CAGAGGGCTCAAAG-3', 反向引物为 5'-ACATCGCCACAAACATAAAGGT-3', PCR 产物为 255 bp; β -actin 正向引物为 5'-TGCTATGTTGC-CCTAGACTTCG-3', 反向引物为 5'-GTTGGCATAG-AGGTCTTTACGG-3', PCR 产物为 240 bp。实时荧光定量 PCR 仪扩增条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 1 min, 40 个循环。每只动物检测一式 3 份, 以 β -actin 为管家基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达的相对变化, 其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{未知样品} - Ct_{未知样品内参}) - (Ct_{基准样品} - Ct_{基准样品内参})$ 。

2.3.4 坐骨神经 HE 染色 收集处死后大鼠左腿的坐骨神经, 利用多聚甲醛固定并保持神经条平直, 经常规脱水、包埋, 按实验室标准将组织切成厚度为 4 ~ 5 μ m, 组织切片再经脱蜡、苏木素-伊红染色、脱水、透明、封固, 即得 HE 染色切片。最后用光学显微镜检测各组织切片中组织形态学的变化。每个标本随机分析 15 个视角。

2.3.5 Western blot 检测 利用研磨器研磨组织后, 取样加入 1% Triton X-100、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA)、2.5 mmol/L 焦磷酸钠、1 mmol/L β -甘油磷酸酯、1 mmol/L

Na_3VO_4 、1 μ g/mL 亮肽素、1 μ g/mL 抑肽酶和 20 mmol/L Tris (pH 7.5), 得蛋白裂解液, 用 Lowry 法测定蛋白质含有量。以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准品, 将蛋白浓度调为一致, 用 10% 的 SDS-PAGE 分离蛋白质, 每个泳道蛋白上样量为 40 μ g [SDS-PAGE 凝胶电泳, 转硝酸纤维素膜, TBS 冲洗、封闭, TBST 冲洗, 将膜放入 I 抗中 4 °C 过夜, TBST 冲洗, 加辣根过氧化物酶 (HRP) (1:1 000) 标记的抗兔免疫球蛋白 G (IgG) 二抗孵育 1 h, 前后分别 TBST 洗 3 次, ECL 发光液 A 和 B 1:1 混合后泡膜, 暗室中感光]。Quantity One 软件分析条带, 得出光密度 (*D*) 值。

2.4 数据处理 数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间数据比较采用 *t* 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 TTPGL 对糖尿病大鼠体质量及生化指标的影响 给药前, 各建模组体质量与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而空腹血糖明显升高 ($P < 0.01$)。正常组体质量为 (490.62 \pm 10.98) g, 且空腹血糖稳定在正常水平, 低于 7.0 mmol/L (表中 FBG 值由血糖仪测得值乘以 18 而得); 模型组大鼠体质量和正常组比较显著降低, 且血糖显著高于正常组 ($P < 0.01$), 并一直维持在高于 15.0 mmol/L 的高血糖状态。与模型组比较, 番石榴叶总三萜给药组以及罗格列酮组大鼠的 NEFA、TG 及 TCH 显著降低 ($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 TTPGL 对糖尿病大鼠体质量及生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Tab. 1 Effects of TTPGL on body weight and biochemical indices in diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	给药前(建模后1周)($n = 15$)		给药8周后($n = 10$)		NEFA/ (μ mol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	TCH/ (mmol·L ⁻¹)
		体质量/g	FBG/(mg·dL ⁻¹)	体质量/g	FBG/(mg·dL ⁻¹)			
正常组	—	325.35 \pm 10.98	82.16 \pm 18.17	490.62 \pm 10.98	108.95 \pm 18.98	183.16 \pm 18.17	0.74 \pm 0.08	1.86 \pm 0.13
模型组	—	322.25 \pm 14.36	396.72 \pm 28.64 ^{##}	323.00 \pm 16.86 ^{##}	399.03 \pm 21.18 ^{##}	454.31 \pm 44.26 ^{##}	5.00 \pm 0.48 ^{##}	6.32 \pm 0.61 ^{##}
TTPGL 低剂量组	30	320.83 \pm 11.67	379.98 \pm 28.34 ^{##}	390.11 \pm 28.86	369.74 \pm 11.67	283.01 \pm 15.71	3.94 \pm 0.41	4.70 \pm 0.53
TTPGL 中剂量组	60	327.05 \pm 22.41	390.96 \pm 27.46 ^{##}	314.10 \pm 16.85	286.28 \pm 19.21*	237.73 \pm 13.29*	2.54 \pm 0.18*	3.58 \pm 0.17*
TTPGL 高剂量组	120	329.53 \pm 20.25	390.60 \pm 27.69 ^{##}	455.71 \pm 16.37*	287.02 \pm 14.72*	229.88 \pm 12.69*	2.69 \pm 0.34*	3.02 \pm 0.32*
罗格列酮组	3	319.58 \pm 26.07	374.58 \pm 25.44 ^{##}	451.00 \pm 17.13*	260.81 \pm 26.39*	198.36 \pm 18.43*	2.43 \pm 0.37*	2.60 \pm 0.47*

注: 与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$

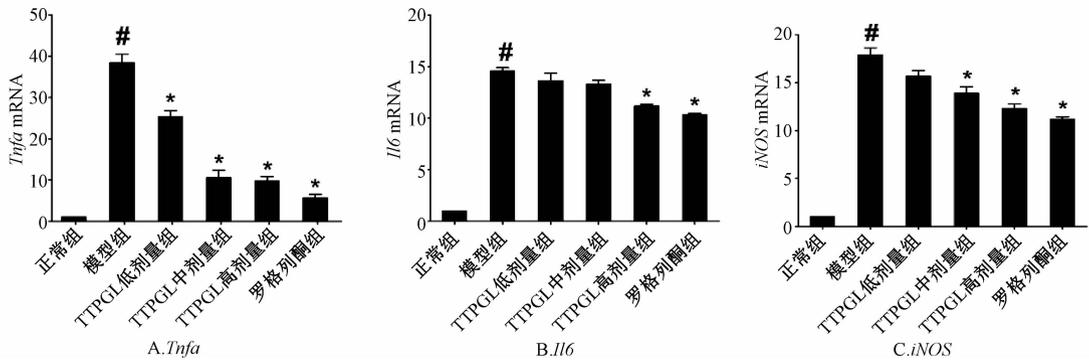
3.2 TTPGL 对糖尿病大鼠坐骨神经 MCV 的影响 本次实验, 分别第 4 周和第 8 周对各组大鼠的坐骨神经传导速度进行了测定。如表 2, 与正常组比较, 经过 STZ 诱导的持续性高血糖影响, 模

型组大鼠坐骨神经在第 8 周的传导速度减慢明显 ($P < 0.01$); 和模型组传导速度相比, TTPGL (120 mg/kg)、罗格列酮组在第 8 周速度测定值中出现显著性改善作用 ($P < 0.05$)。

表2 坐骨神经 MCV 值 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	运动神经传导速度/($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	
		第4周	第8周
正常组	—	61.18 ± 1.01	60.87 ± 0.74
模型组	—	58.82 ± 1.24	52.07 ± 1.19 ^{##}
TTPGL 低剂量组	30	58.13 ± 1.25	56.33 ± 1.28
TTPGL 中剂量组	60	60.51 ± 1.45	54.88 ± 0.74
TTPGL 高剂量组	120	59.81 ± 2.27	57.63 ± 1.18*
罗格列酮组	3	61.78 ± 1.65	57.56 ± 1.10*

注：与正常组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$



注：与正常组比较，[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$

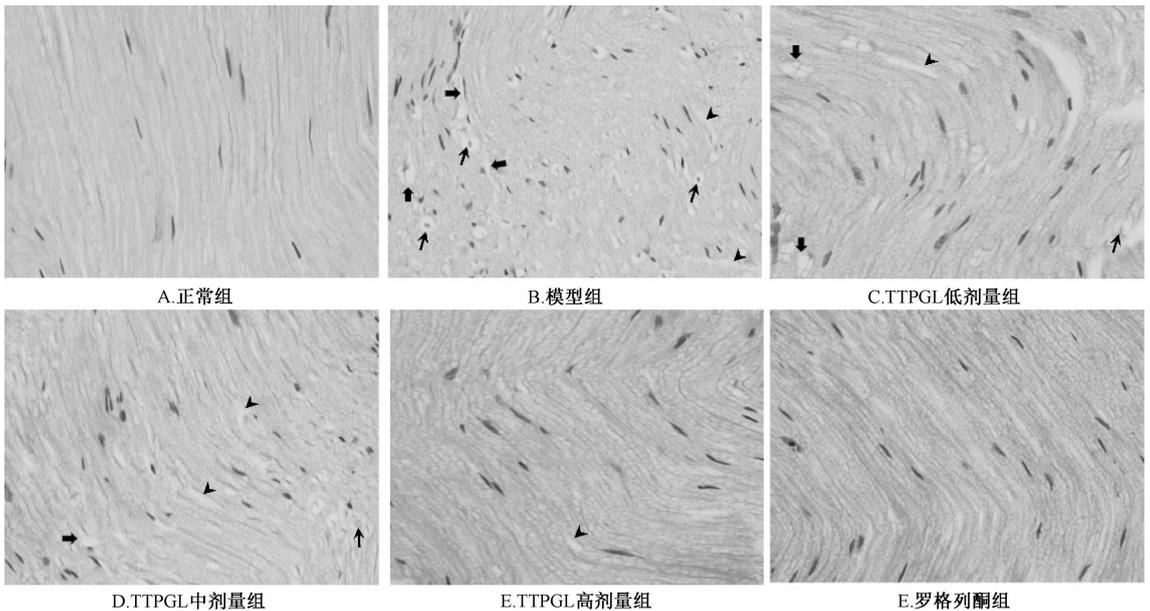
图1 *Tnfa*, *Il6* 和 *iNOS* 基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 1 Gene expressions of *Tnfa*, *Il6* and *iNOS* ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

3.4 TTPGL 对糖尿病大鼠坐骨神经组织形态学的影响 正常组大鼠坐骨神经排列有序，髓鞘清晰，组织间致密无水肿且无游离细胞产生。模型组大鼠坐骨神经结构排列紊乱，髓鞘脱落，组织间水

3.3 TTPGL 对糖尿病大鼠坐骨神经炎症基因表达的影响 如图1，A、B和C分别是 *Tnfa*, *Il6* 和 *iNOS* 基因表达的柱状图。和正常组比较，模型组在各炎症介质基因的表达上均有显著性的增加 ($P < 0.05$)。和模型组比较，TTPGL组和罗格列酮组在各炎症介质基因的表达上，有不同程度的改善作用 ($P < 0.05$)。

肿并游离细胞较多。和模型组相比，TTPGL对神经组织结构的影响，随剂量增加，神经结构排列、组织细胞间的致密度得到不同程度的改善。详见图2。



注：粗箭头表示髓鞘退化，箭头表示水肿，细箭头表示游离细胞

图2 TTPGL 对糖尿病大鼠坐骨神经组织形态学改变的影响 (HE, $\times 400, n = 6$),

Fig. 2 Effect of TTPGL on histological alteration in sciatic nerve in diabetic rats (HE, $\times 400, n = 6$)

3.5 TTPGL对糖尿病大鼠坐骨神经NF- κ B介导的信号通路蛋白的影响 图3为各蛋白表达条带,图4为定量分析各蛋白磷酸化与非磷酸化的比值图。与正常组比较,模型组大鼠p-AKT/AKT, p- $\text{IKK}\alpha$ /IKK α , p-p65/p65值显著性增加($P < 0.01$),即NF- κ B介导的信号通路蛋白磷酸化活性增强。给药后,番石榴叶总三萜和罗格列酮可显著降低各蛋白磷酸化活性在糖尿病大鼠坐骨神经组织中的表达,与模型组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4 讨论

本课题组在前期研究中首次发现番石榴叶总三萜是番石榴叶降血糖的有效部位,其富含特征性的高度氧化的五环三萜酸类化合物如:积雪草酸、乌苏酸、番石榴酸以及齐墩果酸等^[7-9]。糖尿病周围神经病变确定机制较为复杂,2005年美国神经学研究会、电诊断医学协会以及物理康复医学协会将临床上DPN的诊断主要包含有:神经性症状、体

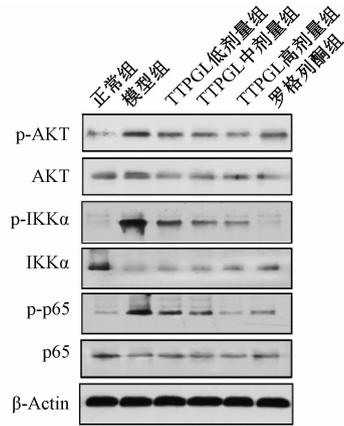
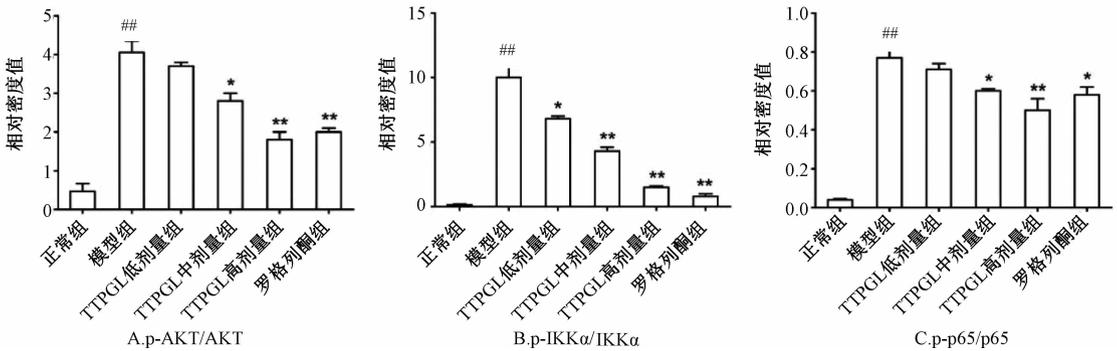


图3 信号通路蛋白表达

Fig. 3 Protein expressions of signal pathways

征以及异常性电诊断^[10]。本实验模型组体重质量下降明显,持续性的高血糖(表1)以及传导速度的异常(表2)等,从而确定模型组动物被STZ诱导8周之后,产生了神经性病变。



注:与正常组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图4 p-AKT/AKT, p- $\text{IKK}\alpha$ /IKK α , p-p65/p65定量分析($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Quantitative analyses of p-AKT/AKT, p- $\text{IKK}\alpha$ /IKK α and p-p65/p65 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

持续性的高血糖将会导致核转录因子NF- κ B介导作用^[11]。炎症因子TNF- α , 介质IL-6以及炎症酶iNOS都能被NF- κ B调控且相互间引起神经炎症的恶性循环^[12],其中iNOS调控的NO是产生神经髓鞘退化的直接原因。而以上由NF- κ B介导的炎症因子在雪旺细胞或者神经元中可表现出对巨噬细胞的募集作用,并能最终导致神经再生性损伤^[13]。因此,将高血糖诱发的神经炎症机制归结于对NF- κ B介导的信号通路探究。本实验结果中的模型组,提示炎症因子表达对神经组织结构的损伤性变化;给药后,各组炎症因子对神经的损伤情况随着给药剂量增加而得到缓解。证实了之前文献报道中番石榴叶提取物所具有的抗炎功效^[14]。

TNF作为在T1DM和T2DM两型糖尿病中作用最普遍的炎症因子^[15-16],在本次试验中,我们将其引起的PI3K酪氨酸磷酸化,激活PI3K/Akt介导的路径^[17-18]作为探究对象。在活性体内,Akt是一种60 kD的丝/苏氨酸蛋白激酶,为PI3K重要的下游组成部分,IKK α (Thr23)磷酸化的募集激活NF- κ B RelA(p65)^[19],并最终导致炎症介质产生、神经组织损伤的恶性循环。实验结果可知,番石榴叶总三萜通过下调p-AKT/AKT、p- $\text{IKK}\alpha$ /IKK α 、p-p65/p65值,减少了由NF- κ B-p-p65介导的炎症介质的产生,并进一步缓解神经组织损伤,达到改善周围神经病变的效果。

综上所述,本实验探究番石榴叶提取物

TTPGL对DPN的作用及其机制,其结果显示,TTPGL改善坐骨神经的传导速度、减少坐骨神经炎症介质的产生和神经结构的损伤,并可能通过抑制NF- κ B产生的信号通路蛋白磷酸化活性而达到减少炎症产生的效果。

参考文献:

[1] 侯瑞芳, 汤正义, 宁光. 糖尿病周围神经病变的检查方法及其诊断效率[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2006, 26(4): 270-272.

[2] Edwards J L, Vincent A M, Cheng H T, et al. Diabetic neuropathy: mechanisms to management [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 120(1): 1-34.

[3] Cameron N E, Cotter M A. Pro-inflammatory mechanisms in diabetic neuropathy: focus on the nuclear factor kappa B pathway [J]. *Curr Drug Targets*, 2008, 9(1): 60-67.

[4] 王婧茹, 赵晶晶, 叶春玲, 等. 番石榴叶总三萜对2型糖尿病大鼠的降血糖和血脂作用[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(6): 1109-1113.

[5] 匡乔婷, 赵晶晶, 叶春玲, 等. 番石榴叶总三萜对2型糖尿病大鼠肾损伤的保护作用[J]. 中药材, 2012, 35(1): 74-97.

[6] Kawakami Y, Nakamura T, Hosokawa T, et al. Antiproliferative activity of guava leaf extract via inhibition of prostaglandin endoperoxide H synthase isoforms [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2009, 80(5-6): 239-245.

[7] Shao M, Wang Y, Huang X J, et al. Four new triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14(4): 348-354.

[8] Begum S, Hassan S I, Siddiqui B S, et al. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(4): 399-403.

[9] 郭翔宇, 刘铜华, 朱寅荻, 等. 番石榴叶化学成分及其治疗2型糖尿病研究进展[J]. 世界科学技术: 中医药现代

化, 2014, 16(5): 619-628.

[10] Albers J W, Pop-Busui R. Diabetic neuropathy: mechanisms, emerging treatments, and subtypes [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2014, 14(8): 473.

[11] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication [J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 813-820.

[12] Kim Y W, Zhao R J, Park S J, et al. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappa B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154(1): 165-173.

[13] Conti G, Scarpini E, Baron P, et al. Macrophage infiltration and death in the nerve during the early phases of experimental diabetic neuropathy: a process concomitant with endoneurial induction of IL-beta and p75NTR [J]. *J Neurol Sci*, 2002, 195(1): 35-40.

[14] Gutierrez R M P, Mitchell S, Solis R V. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(1): 1-27.

[15] Gomes M B, Piccirillo L J, Nogueira V G, et al. Acute-phase proteins among patients with type 1 diabetes [J]. *Diabetes Metab*, 2003, 29(4): 405-411.

[16] Gonzalez-Clemente J M, Mauricio D, Richart C, et al. Diabetic neuropathy is associated with activation of the TNF-alpha system in subjects with type 1 diabetes mellitus [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2005, 63(5): 525-529.

[17] Romashkova J A, Makarov S S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling [J]. *Nature*, 1999, 401(6748): 86-90.

[18] Kane L P, Shapiro V S, Stokoe D, et al. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(11): 601-604.

[19] Ozes O N, Mayo L D, Gustin J A, et al. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase [J]. *Nature*, 1999, 401(6748): 82-85.