

• 药理与临床 •

氧化苦参碱对棕榈酸诱导的人脐静脉内皮细胞胰岛素抵抗的作用及机制

王 莉, 曾文靖, 王超文, 罗臻硕, 黄起壬*

南昌大学药学院, 江西 南昌 330006

摘要:目的 探讨氧化苦参碱 (oxymatrine, OMT) 对棕榈酸 (palmitic acid, PA) 诱导的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 作用及机制。方法 通过 PA (0.25 mmol/L) 诱导 HUVECs 建立 IR 模型后, 进行 OMT 的量效关系和时效关系研究, 筛选出 OMT 的最佳作用浓度和最佳作用时间。CCK-8 法检测 HUVECs 活力; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察细胞形态; Western blotting 检测细胞磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase, p-PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 通路、激活信号传导及转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 蛋白抑制因子 1 (protein inhibitor of activated STAT 1, PIAS1) 蛋白表达; 试剂盒检测一氧化氮 (nitric oxide, NO) 水平。根据筛选出的 OMT 最佳浓度 (4 μ mol/L) 和作用时间 (48 h), 敲低 PIAS1 进行机制探讨, Western blotting 检测 PIAS1、核因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 蛋白表达; 荧光探针 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; ELISA 法检测白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平; 免疫荧光法观察 NF- κ B p65 核转位情况。结果 随着 OMT 作用浓度和时间的增加, PI3K/Akt/eNOS 通路和 PIAS1 蛋白表达量及 NO 水平均增加 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。转染 Ad-PIAS1-RNAi 后, NF- κ B p65 蛋白表达量、ROS 和 IL-6 水平均显著增加 ($P < 0.01$ 、0.001), NF- κ B p65 入核程度显著增强 ($P < 0.05$ 、0.01), 而 OMT 可以部分逆转上述作用 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结论 OMT 能改善 PA 体外诱导的血管内皮 IR, 其机制主要是通过上调 PIAS1 通路减轻高脂诱导的炎症反应和氧化应激。

关键词: 氧化苦参碱; 人脐静脉内皮细胞; 棕榈酸; 胰岛素抵抗; PIAS1; 炎症反应; 氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)14-4530-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.14.013

Effect and mechanism of oxymatrine on human umbilical vein endothelial cells insulin resistance induced by palmitic acid

WANG Li, ZENG Wen-jing, WANG Chao-wen, LUO Zhen-shuo, HUANG Qi-ren

College of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330006, China

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of oxymatrine (OMT) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) insulin resistance (IR) induced by palmitic acid (PA). **Methods** IR model was established by PA (0.25 mmol/L)-induced HUVECs. The dose-effect relationship and time-effect relationship of OMT were studied, and the optimal concentration and time of OMT were selected. The cell viability was examined by CCK-8. The cell morphology was observed by HE staining. The protein expressions of phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase (p-PI3K)/protein kinase B (Akt)/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) pathway and protein inhibitor of activated STAT 1 (PIAS1) were detected by Western blotting. Nitric oxide (NO) level was detected by kit. According to the optimal concentration (4 μ mol/L) of OMT and action time (48 h), the mechanism of knocking down PIAS1 was discussed. PIAS1 and nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) protein expressions were determined by Western blotting. The generation of reactive oxygen species (ROS) was observed by fluorescence probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). Interleukin-6 (IL-6) level was detected by ELISA. NF- κ B p65 nuclear translocation was determined by immunofluorescence. **Results**

收稿日期: 2023-03-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81960153); 南昌大学“大学生创新创业训练计划”项目 (2022CX267)

作者简介: 王 莉 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为内分泌代谢性疾病药理学。E-mail: 2211292469@qq.com

*通信作者: 黄起壬 (1967—), 男, 教授, 研究方向为内分泌代谢性疾病药理学。E-mail: qrhuang@ncu.edu.cn

The protein expressions of PI3K/Akt/eNOS pathway and PIAS1 and NO level were significantly increased with the concentration and treatment time of OMT increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). After infection with Ad-PIAS1-RNAi, NF- κ B p65 protein expression and levels of ROS, IL6 were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), and the NF- κ B p65 nuclear translocation was significantly enhanced ($P < 0.05, 0.01$). The above effects produced by Ad-PIAS1-RNAi were partially reversed by OMT intervention ($P < 0.05, 0.01, 0.001$).

Conclusion OMT can improve IR by up-regulating PIAS1 pathway to alleviate the inflammation and oxidative stress induced by PA in vascular endothelium *in vitro*.

Key words: oxymatrine; human umbilical vein endothelial cells; palmitic acid; insulin resistance; PIAS1; inflammation; oxidative stress

随着全球肥胖率的增加,胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)以及相关心血管疾病的患病率也在增加^[1]。IR 是肥胖和 2 型糖尿病的共同病理特征^[2]。IR 涉及多种分子和病理生理机制,是代谢紊乱、脂毒性、糖毒性和炎症等相互作用的结果^[3]。血管内皮 IR 是肥胖并发血管疾病的始动环节,是滋生“代谢综合征”的共同“土壤”^[4]。现在普遍认为 IR 也是一种慢性炎症过程,炎症导致 IR 的分子机制是近年研究的热点之一。

氧化苦参碱是从豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 中提取分离得到的一种喹诺里西啶类生物碱,具有抗炎、抗氧化、抗纤维化、心血管保护等多种药理作用^[5-7]。研究表明,氧化苦参碱能够抑制同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞的凋亡,减轻内皮细胞功能障碍^[8-9],从而为氧化苦参碱在预防动脉粥样硬化中的作用提供了新的视角;然而,其确切的机制尚未完全阐明。激活信号传导及转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)蛋白抑制因子(protein inhibitor of activated STAT, PIAS)是一类活化的 STAT 基因抑制蛋白。研究表明,PIAS1 是一种 E3 连接酶,可以通过泛素化或类泛素化蛋白修饰依赖途径调控许多转录因子如 Glis3 的转录活性从而调节胰岛素信号^[10]。已有研究表明氧化苦参碱可改善 IR^[11],且可以调控肾小球细胞 PIAS1 蛋白表达^[12];同时课题组前期研究发现 PIAS1 可 SUMO 化修饰过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptors γ , PPAR γ),从而导致血管内皮 IR^[13]。由此推测氧化苦参碱可能通过调控 PIAS1 影响棕榈酸诱导的 IR。因此,探明氧化苦参碱的这一作用将为 IR 相关心血管疾病的治疗奠定实验基础,对于降低糖尿病患者心脑血管事件发生、改善患者生存质量具有重要意义。

1 材料

1.1 细胞

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein

endothelial cell, HUVECs) 购自美国 ATCC。

1.2 药品与试剂

氧化苦参碱(批号 HY-NO158, 质量分数 $\geq 98.0\%$) 购自上海皓元生物医药科技有限公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;DMEM 培养基、苏木素-伊红(HE)染液购自北京 Solarbio 公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒(批号 A013-2-1) 购自南京建成生物;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(批号 2H-KMLJ201) 购自南京卡米诺生物;荧光探针 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号 C1300-1) 购自北京普利莱基因技术有限公司;Ad-PIAS1-RNAi 病毒(批号 133511D) 购自上海吉凯生物;内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、PIAS1、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase, p-PI3K) 抗体(批号分别为 5880S、3550S、17366S) 购自美国 CST 公司;PI3K 抗体(批号 PTM-5198) 购自景杰生物;核因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 抗体(批号 00096033) 购自武汉三鹰;磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 抗体(批号 334286) 购自上海艾比玛特医药科技有限公司;Akt 抗体(批号 ET1607-73) 购自杭州华安生物;山羊抗小鼠二抗(批号 BST17E27C17F50)、山羊抗兔二抗(批号 BST17G08A17G54)、 β -actin 抗体(批号 18C03A27) 购自武汉博士德生物。

1.3 仪器

SW-CJ-1F 型超净工作台(苏州苏净安泰公司);Forma311 型 CO₂ 培养箱购自(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);8K43352 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);DYY-6C 型垂直电泳-转膜系统(北京六一生物科技有限公司);Enspire 680 型酶标仪(美国 Perkinelmer 公司);A1HD25 型激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 棕榈酸诱导血管内皮细胞 IR 模型的建立

参照文献方法^[14-16]建立 HUVECs IR 模型。用 0.25 mmol/L 的棕榈酸作用于 HUVECs 48 h, 然后用胰岛素 (100 nmol/L) 处理 30 min^[17]。

2.2 CCK-8 筛选药物安全范围

将 HUVECs 均匀接种于 96 孔板上, 当细胞铺满培养板 70% 时使用梯度浓度 (0、2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$) 的氧化苦参碱对 HUVECs 处理 48 h, 通过 CCK-8 法检测细胞活力。

细胞活力 = $(A_{\text{样品}} - A_{\text{校正}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{校正}})$

2.3 氧化苦参碱最佳作用浓度和最佳孵育时间的确定

设置对照组、模型组和氧化苦参碱 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 组, 除对照组外, 其余各组用棕榈酸和不同浓度的氧化苦参碱处理 48 h, 最后用胰岛素 (100 nmol/L) 处理 30 min, 采用 HE 染色观察细胞形态, 分别收集细胞培养液和细胞, 检测细胞培养液中 NO 水平, 检测细胞中 PI3K/Akt/eNOS 通路和 PIAS1 蛋白表达情况。

确定最佳作用浓度后, 探究最佳作用时间。设置对照组、模型组和给药组, 除对照组外, 其余各组用棕榈酸处理 48 h, 给药组用 4 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱分别处理 24、36、48 h, 最后用胰岛素 (100 nmol/L) 处理 30 min, 收集细胞, 检测细胞中 PI3K/Akt/eNOS 通路蛋白表达情况。

2.4 敲减 PIAS1 对氧化苦参碱改善棕榈酸诱导的 HUVECs IR 的影响

根据筛选出的氧化苦参碱最佳浓度 (4 $\mu\text{mol/L}$) 和作用时间 (48 h), 设置对照 + 空载病毒组、棕榈酸 + 空载病毒组、棕榈酸 + 氧化苦参碱 + 空载病毒组、对照 + siRNA-PIAS1^[18]组、棕榈酸 + siRNA-PIAS1、棕榈酸 + 氧化苦参碱 + siRNA-PIAS1 组, 含棕榈酸组均用 0.25 mmol/L 棕榈酸处理 48 h, 含氧化苦参碱组均用 4 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱处理 48 h, 转染组在进行棕榈酸和氧化苦参碱处理后, 用无血清培养基分别转染 48 h, 检测细胞中 PI3K/Akt/eNOS 通路、PIAS1 和 NF- κ B p65 蛋白表达情况, 检测细胞上清液中 IL-6 含量, 检测细胞内 ROS 水平。

2.5 NO、IL-6 水平的检测

按照试剂盒说明书检测 NO 和 IL-6 水平。

2.6 Western blotting 检测蛋白表达

收集细胞, 裂解提取蛋白, 并测定总蛋白浓度。

加入上样缓冲液, 煮沸 10 min 使蛋白变性, 蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入脱脂牛奶封闭 2 h, 加入一抗 (1:1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 洗膜, 加入二抗 (1:2000), 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 用 ELC 化学发光法进行显影, 采用 Image J 软件分析。

2.7 HE 染色观察细胞形态

细胞经过处理后, 用 PBS 清洗干净, 用苏木素染细胞核 5 min, 洗净加入伊红染细胞质 1 min, 在显微镜下观察形态并拍照。

2.8 激光共聚焦显微镜检测 NF- κ B p65 亚细胞定位

将细胞均匀接种于激光共聚焦显微镜专用培养皿中。细胞经分组处理后, 加入 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, 随后加入 0.1% TritonX-100 通透 10 s, 洗净后加入 5% 牛血清白蛋白, 室温封闭 2 h, 然后加入 NF- κ B p65 一抗 (1:800), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 次日加入荧光二抗 (1:400), 室温孵育 2 h, 然后 DAPI (1:10) 染核 5 min, PBS 洗净后在激光共聚焦显微镜下观察并拍照, 利用 Image J 软件进行分析。

2.9 ROS 水平检测

细胞经分组处理后, 弃去培养基, 用 PBS 冲洗细胞表面加入用无血清培养基稀释的 DCFH-DA (1:1000), 培养箱孵育 30 min, PBS 清洗干净后, 置于荧光倒置显微镜下观察, 并计算各组相对荧光强度。

2.10 统计学分析

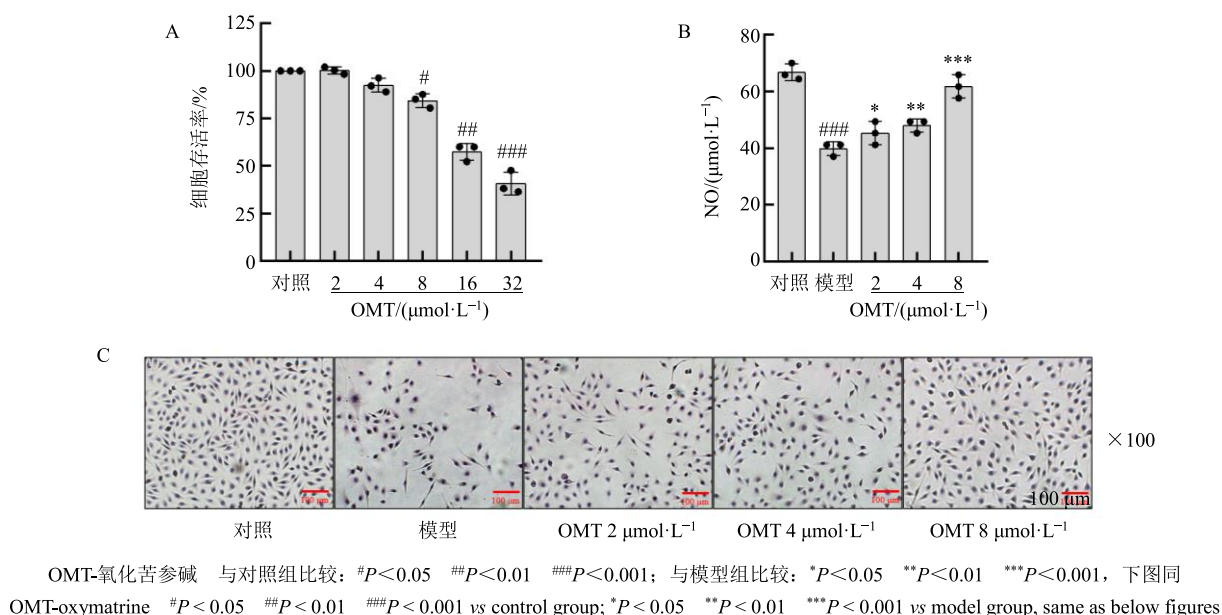
采用 Graphpad Prism 8.0.1 软件对数据进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间的均数分析采用单因素或双因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 氧化苦参碱对 HUVECs 活力、NO 水平及细胞形态的影响

如图 1-A 所示, 与对照组比较, 2、4 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱对 HUVECs 活力无明显影响, 8 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱对细胞活力有影响 ($P < 0.05$), 16、32 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱显著抑制细胞活力 ($P < 0.01$ 、0.001), 具有一定的细胞毒性, 因此确定药物的安全浓度范围 0~8 $\mu\text{mol/L}$, 选择 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 的氧化苦参碱进行后续实验。

如图 1-B 所示, 与对照组比较, 模型组上清液中 NO 水平显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 NO 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、



0.001), 表明氧化苦参碱可以改善棕榈酸导致的 NO 分泌受阻。如图 1-C 所示, 对照组细胞生长状态良好, 细胞形态呈鹅卵石状且轮廓清晰, 排列紧密, 贴壁良好; 模型组细胞生长停滞, 细胞间隙增大, 细胞皱缩变长失去原有形态; 给予氧化苦参碱干预后, 细胞逐渐恢复基本结构, 细胞轮廓逐渐清晰, 细胞间间隙明显缩小。

3.2 不同浓度氧化苦参碱对棕榈酸诱导的 HUVECs 中 PI3K/Akt/eNOS 通路相关蛋白表达的影响

血管内皮细胞作为胰岛素作用的靶细胞, 胰岛素可作用于血管内皮细胞膜上的胰岛素受体, 进而通过 PI3K/Akt/eNOS 通路诱导 NO 的分泌。若出现 IR, 则会导致 PI3K/Akt/eNOS 通路传导障碍^[19]。因此, 考察了不同浓度氧化苦参碱对 PI3K/Akt/eNOS 通路蛋白表达的影响。如图 2 所示, 与对照组比较,

模型组 PI3K/Akt/eNOS 通路相关蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.001$), 表明棕榈酸诱导的 IR 模型建立成功^[20]。与模型组比较, 各给药组细胞中 PI3K/Akt/eNOS 通路相关蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 表明氧化苦参碱可改善棕榈酸诱导的 PI3K/Akt/eNOS 通路传导的障碍, 且呈剂量相关性。

3.3 氧化苦参碱不同作用时间对棕榈酸诱导的 HUVECs 中 PI3K/Akt/eNOS 通路相关蛋白表达的影响

如图 3 所示, 与模型组比较, 氧化苦参碱处理 24、36、48 h 后 PI3K/Akt/eNOS 通路相关蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。表明氧化苦参碱呈时间相关性改善棕榈酸诱导的该胰岛素信号通路传导的障碍。

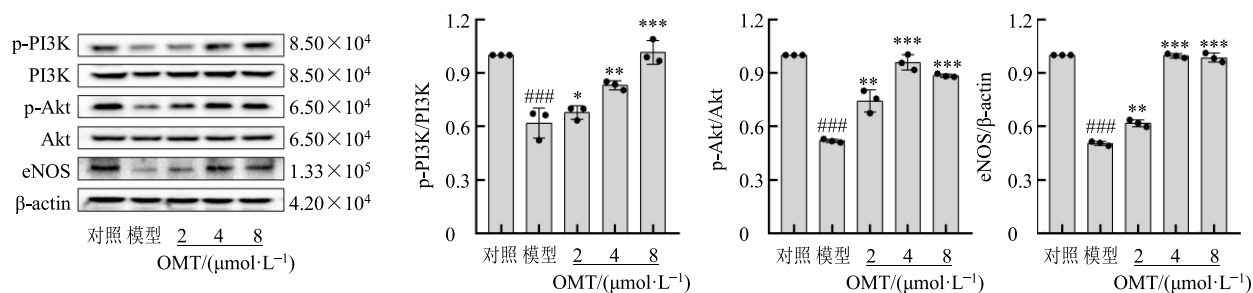


图 2 不同浓度氧化苦参碱对棕榈酸诱导的 HUVECs 中 PI3K/Akt/eNOS 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of different concentrations of oxymatrine on PI3K/Akt/eNOS pathway related protein expressions in palmitic acid-induced HUVECs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

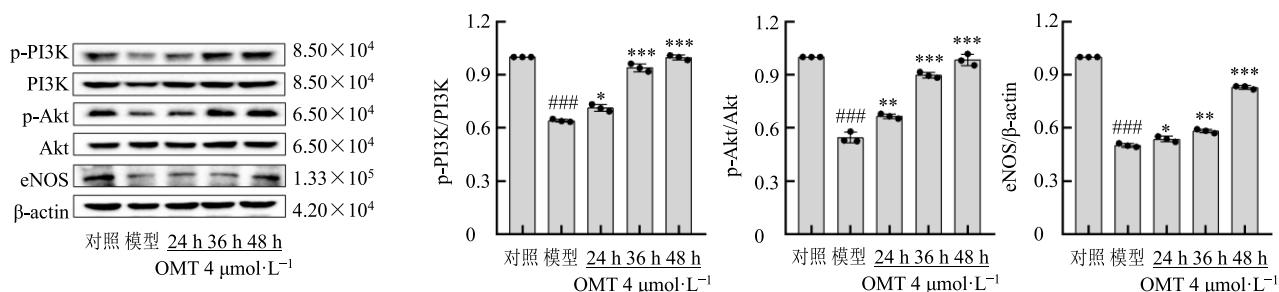


图 3 氧化苦参碱不同作用时间对棕榈酸诱导的 HUVECs 中 PI3K/Akt/eNOS 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of different treatment time of oxymatrine on PI3K/Akt/eNOS pathway related protein expressions in palmitic acid-induced HUVECs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 敲减 PIAS1 对氧化苦参碱改善 IR 的影响

如图 4 所示, 与对照+空载病毒组比较, 棕榈酸+空载病毒组 PI3K/Akt/eNOS 通路相关蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01, 0.001$); 与棕榈酸+空载病毒组比较, 棕榈酸+氧化苦参碱+空载病毒组 PI3K/Akt/eNOS 通路相关蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$), 表明氧化苦参碱可对抗棕榈酸对 PI3K/Akt/eNOS 通路的抑制作用, 氧化苦参碱可改善棕榈酸诱导的 IR。敲减 PIAS1 后, 氧化苦参碱对 IR 的改善作用被部分消除, 表明氧化苦参碱改善 IR 的作用至少部分是由 PIAS1 介导。

3.5 敲减 PIAS1 对 PIAS1、NF-κB p65 表达及 IL-6 水平的影响

由于 PIAS1 是 JNK/STAT 炎症应激通路的抑制蛋白, 故首先研究了不同浓度的氧化苦参碱是否能上调 PIAS1 的表达来发挥抗炎作用。如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组 PIAS1 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 PIAS1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 呈剂量相关性, 表明氧化苦参碱可以上调 PIAS1 表达。

为了探讨氧化苦参碱发挥抗炎作用是否依赖于 PIAS1, 设计针对 PIAS1 的 siRNA 来下调 PIAS1。

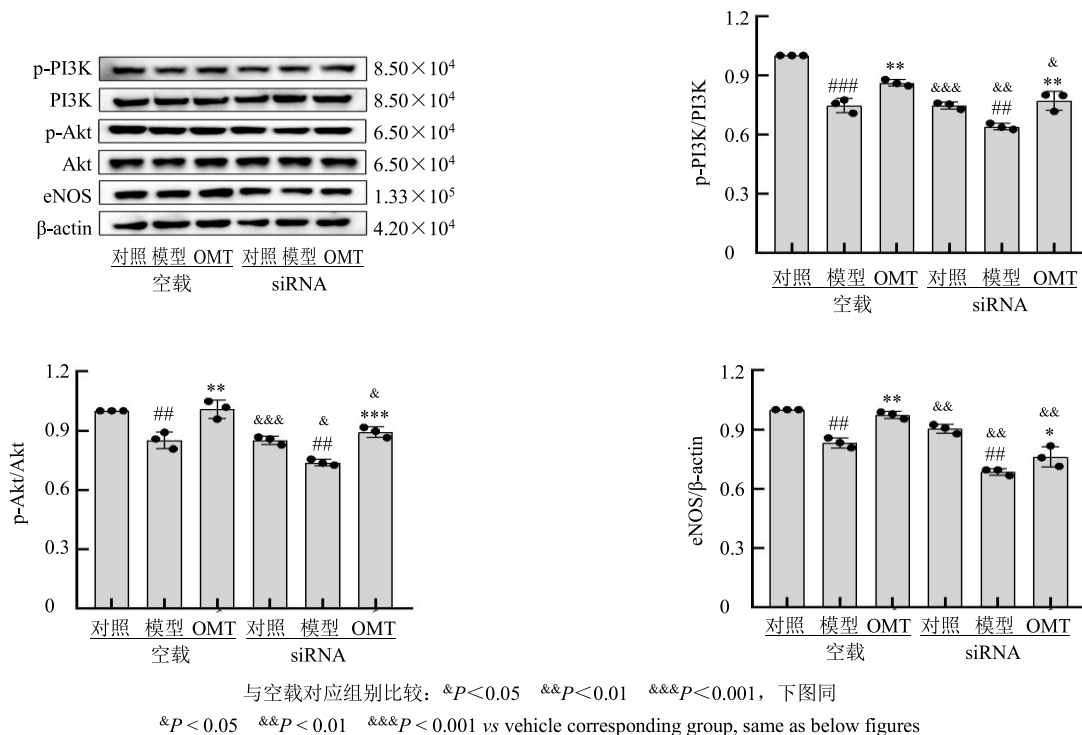


图 4 PIAS1 敲减对 PA 诱导的 HUVECs 中 PI3K/Akt/eNOS 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of knockdown PIAS1 on PI3K/Akt/eNOS pathway related protein expressions in palmitic acid-induced HUVECs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

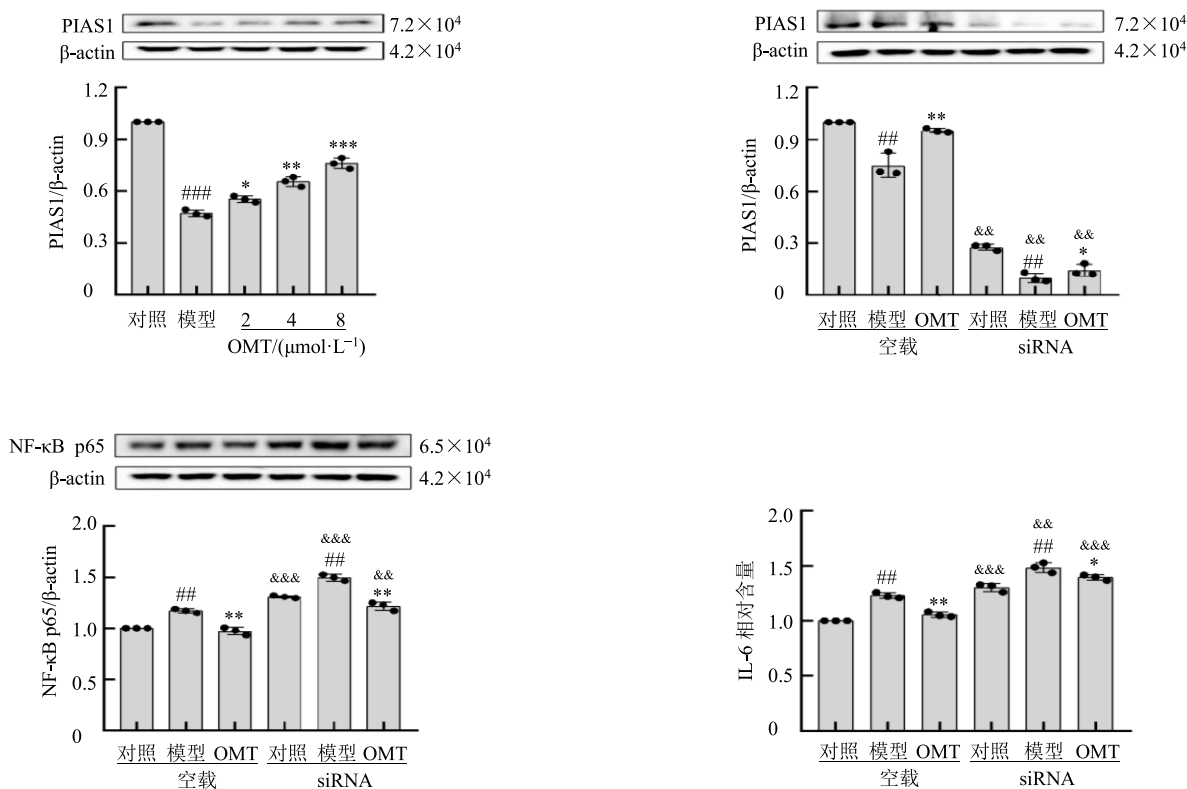


图 5 PIAS1 敲减对 PIAS1、NF-κB p65 表达及 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of knockdown PIAS1 on PIAS1 and NF-κB p65 expressions and IL-6 level ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

结果显示,与空载组比较,siRNA 组 PIAS1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$),说明 PIAS1 成功沉默。本研究还探究了敲低 PIAS1 对 NF-κB p65 蛋白表达和 IL-6 水平的影响,结果显示,在 PIAS1 未敲减时,氧化苦参碱可逆转棕榈酸诱导的 NF-κB p65 表达和 IL-6 水平的增加 ($P < 0.01$),表明氧化苦参碱具有抗炎作用;在 PIAS1 敲减时,各组 NF-κB p65 表达和 IL-6 水平均较空载组显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001),说明氧化苦参碱和 PIAS1 具有类似

抗炎作用,且氧化苦参碱的抗炎作用可被 PIAS1 敲减部分逆转。

3.6 PIAS1 敲减对 NF-κB p65 核移位的影响

NF-κB p65 作为核转录因子,在正常情况下存在于细胞质中,而发生炎症反应时会转移入核。接下来探究了敲低 PIAS1 对 NF-κB p65 核移位的影响。如图 6 所示,在 PIAS1 未敲减时,氧化苦参碱可逆转棕榈酸诱导的 NF-κB p65 核移位 ($P < 0.05$),表明氧化苦参碱具有抑制 NF-κB p65 核移位作用;

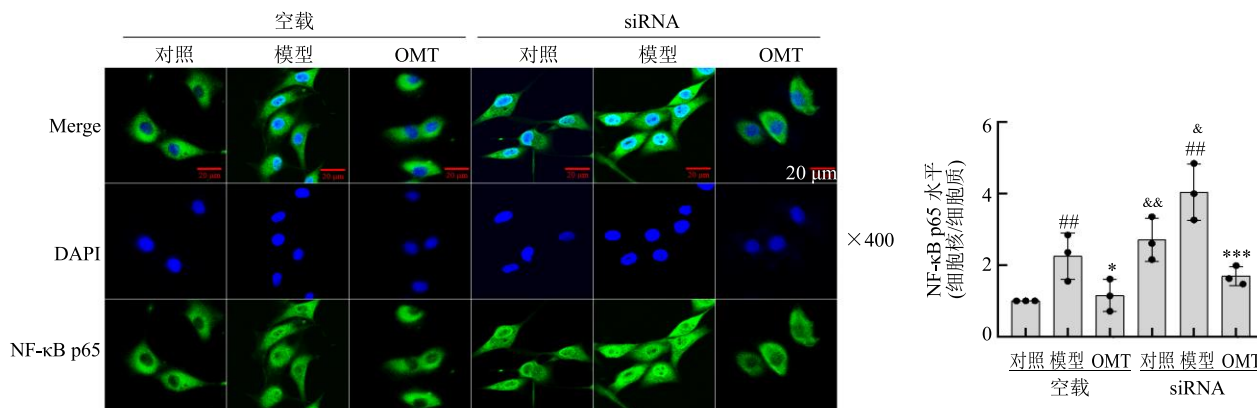


图 6 PIAS1 敲减对 NF-κB p65 核移位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of knockdown PIAS1 on nuclear localization of NF-κB p65 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

在 PIAS1 敲减时, 各组细胞核内的 NF- κ B p65 水平均较空载组显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 说明氧化苦参碱和 PIAS1 具有类似的抗 NF- κ B p65 核移位作用, 且氧化苦参碱的抗 NF- κ B p65 核移位作用可被 PIAS1 敲减部分逆转。

3.7 PIAS1 敲减对 ROS 水平的影响

高脂血症常伴有氧化应激的增加。因此, 探讨

了 PIAS1 敲减对氧化应激的影响。如图 7 所示, 在 PIAS1 未敲减时, 氧化苦参碱可逆转棕榈酸诱导的 ROS 水平增加 ($P < 0.01$), 表明氧化苦参碱具有抗氧化应激作用; 在 PIAS1 敲减时, 各组细胞内 ROS 水平均较空载组显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001), 说明氧化苦参碱和 PIAS1 具有类似的抗氧化应激作用, 且氧化苦参碱的抗氧化应激作用可被 PIAS1 敲减部分逆转。

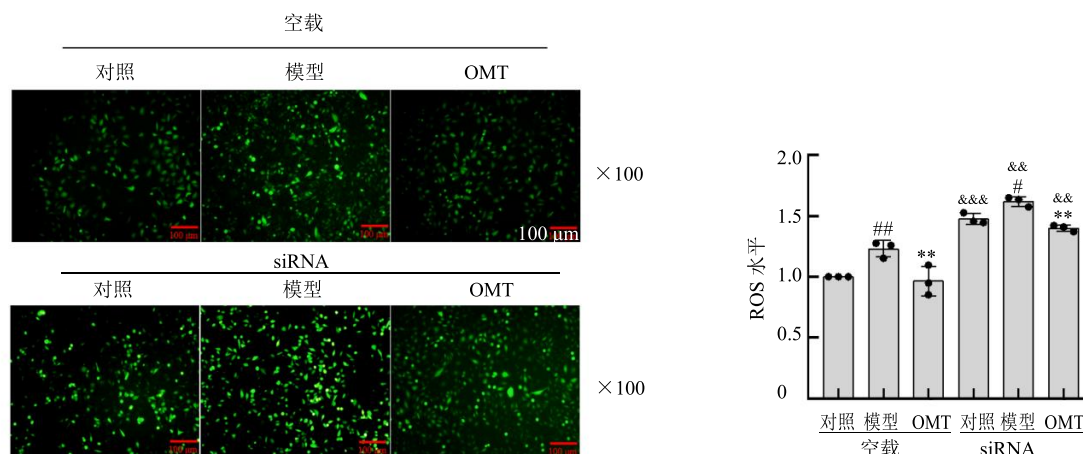


图 7 PIAS1 敲减对 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of knockdown PIAS1 on ROS generation ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

胰岛素抵抗是代谢综合征的关键组成部分, 先于糖尿病、心血管疾病和阿尔茨海默病的发展。其病因途径尚不明确, 但已建立许多促成机制^[21]。近年来, 有很多关于内皮细胞 IR 的研究, 课题组前期已经证实高脂可以诱导内皮细胞 IR^[13], 因此, 本研究基于课题组前期构建的细胞高脂模型进行研究, 采用 0.25 mmol/L 的棕榈酸诱导 HUVECs IR^[19], 通过检测 NO 水平和 PI3K/Akt/eNOS 通路蛋白表达, 证实此模型构建成功。

氧化苦参碱是一种天然生物活性化合物, 具有改善 IR 的作用。研究发现, 氧化苦参碱能够通过多种途径改善 IR, 如抑制 p38 的磷酸化来缓解肝脏中的氧化应激, 调节肝脏 KH 型剪接调控蛋白 (KH-type splicing regulatory protein, KSRP)、10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因 (gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN) 和 Akt 表达, 抑制炎症通路 NF- κ B p65 蛋白表达, 直接调节胰岛素 PI3K/Akt/eNOS 通路, 抑制炎症因子水平等^[6-8, 11, 22-23]。本实验证实氧化苦参碱能够呈浓度和时间相关性改善棕榈酸诱导的 HUVECs IR, 主要机制是通过减少炎症因

子 IL-6 的分泌、炎症标志蛋白 NF- κ B p65 的表达、氧化应激标志物 ROS 的生成以及抑制 NF- κ B p65 核转位。相关研究表明, PIAS1 缺乏通过激活 NF- κ B 途径加重 IR 后心肌细胞凋亡和炎症反应^[24], 过表达 PIAS1 会抑制炎症^[25-26]。本研究发现, PIAS1 敲减使 HUVECs 中总 NF- κ B p65 含量显著上升, 对其细胞核内含量影响大, 这是由于在细胞核中 PIAS1 通过与 p65 的特异性结合充当 NF- κ B 的负调节因子, PIAS1 阻止 NF- κ B 二聚体与 DNA 上的 κ B 位点对接, 从而严格控制 NF- κ B 介导的基因表达^[27], 后续应进一步分别观察胞质和胞核 NF- κ B p65 蛋白的表达量。相关研究发现 PIAS1 的存在是对部分 (17%~24%) 基因进行 ROS 依赖性调节的要求^[28]。作为 STAT 基因抑制蛋白, PIAS1 敲减使 ROS 水平上调; 而加入氧化苦参碱干预后, 上述 PIAS1 敲减的效应均能被显著逆转。表明氧化苦参碱调控 PIAS1 主要是通过抑制炎症反应和氧化应激。

综上, 本研究主要通过棕榈酸建立 IR 模型, IR 会引发炎症反应和氧化应激, 导致细胞受损。通过氧化苦参碱干预治疗可以减轻炎症和氧化应激。氧化苦参碱也可以通过增加 PIAS1 蛋白表达减轻 IR, 这为防治糖尿病提供一条新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hill M A, Yang Y, Zhang L, *et al.* Insulin resistance, cardiovascular stiffening and cardiovascular disease [J]. *Metabolism*, 2021, 119: 154766.
- [2] Mastrototaro L, Roden M. Insulin resistance and insulin sensitizing agents [J]. *Metabolism*, 2021, 125: 154892.
- [3] Khalid M, Alkaabi J, Khan M A B, *et al.* Insulin signal transduction perturbations in insulin resistance [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8590.
- [4] Weiss R, Bremer A A, Lustig R H. What is metabolic syndrome, and why are children getting it? [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1281(1): 123-140.
- [5] Liu Y, Wang H, Liu N, *et al.* Oxymatrine protects neonatal rat against hypoxic-ischemic brain damage via PI3K/Akt/GSK3 β pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 254: 116444.
- [6] Liang J, Chang B, Huang M, *et al.* Oxymatrine prevents synovial inflammation and migration via blocking NF- κ B activation in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 105-111.
- [7] 张明发, 沈雅琴. 氧化苦参碱的肾脏保护作用及其机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2021, 36(8): 1761-1764.
- [8] Wu B, Yue H, Zhou G H, *et al.* Protective effects of oxymatrine on homocysteine-induced endothelial injury: Involvement of mitochondria-dependent apoptosis and Akt-eNOS-NO signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 864: 172717.
- [9] Zhang Y Y, Zhang Y, Tang J Y, *et al.* Oxymatrine inhibits homocysteine-mediated autophagy via MIF/mTOR signaling in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(5): 1893-1903.
- [10] Hoard T M, Yang X P, Jetten A M, *et al.* PIAS-family proteins negatively regulate Glis3 transactivation function through SUMO modification in pancreatic β cells [J]. *Heliyon*, 2018, 4(7): e00709.
- [11] Zuo M L, Wang A P, Tian Y, *et al.* Oxymatrine ameliorates insulin resistance in rats with type 2 diabetes by regulating the expression of KSRP, PETN, and AKT in the liver [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 16185-16194.
- [12] 党红星, 金玉, 李宇宁, 等. 氧化苦参碱对脂多糖诱导的人肾小球系膜细胞增殖 p-STAT1/PIAS1 信号分子的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(17): 1645-1648.
- [13] Kong Y, Niu A, Yuan W, *et al.* Interaction of FOXO1 and SUMOylated PPAR γ 1 induced by hyperlipidemia and hyperglycemia favors vascular endothelial insulin resistance and dysfunction [J]. *Vasc Pharmacol*, 2022, 147: 107125.
- [14] Huang Q Q, Chen S, Xiong X W, *et al.* Asprosin exacerbates endothelium inflammation induced by hyperlipidemia through activating IKK β -NF- κ Bp65 pathway [J]. *Inflammation*, 2023, 46(2): 623-638.
- [15] 曹莹康. 姜黄素通过维持内质网蛋白稳态改善棕榈酸诱导的人脐静脉内皮细胞胰岛素抵抗 [D]. 武汉: 武汉大学, 2019.
- [16] 王丽婧, 孙浩. 丹皮酚对 PA 诱导的大鼠血管内皮细胞的胰岛素抵抗和氧化应激的拮抗作用 [J]. *毒理学杂志*, 2020, 34(2): 150-154.
- [17] 周予梦, 夏敏, 尹婷婷, 等. 香橙素通过 PPAR γ 介导改善血管内皮细胞胰岛素抵抗 [J]. *江西医药*, 2021, 56(3): 269-272.
- [18] Lan D Y, Shen X D, Yuan W W, *et al.* Sumoylation of PPAR γ contributes to vascular endothelium insulin resistance through stabilizing the PPAR γ -NcoR complex [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 19663-19674.
- [19] 李德锋, 樊金玲, 杜琳, 等. 光甘草定通过调节 ERK/IRS-1 和 PI3K/Akt 信号通路改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗 [J]. *中草药*, 2022, 53(24): 7751-7762.
- [20] 夏敏, 涂以思, 熊小伟, 等. Foxo6 在高糖高脂应激诱导血管内皮细胞胰岛素抵抗中的表达及与 NF- κ B 通路的相互作用 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(4): 552-561.
- [21] Onyango A N. Cellular stresses and stress responses in the pathogenesis of insulin resistance [J]. *Oxidative Med Cell Longev*, 2018, 2018(7): 1-27.
- [22] 王超, 张会欣, 邢邯英, 等. 氧化苦参碱改善高脂诱导 ApoE $^{-/-}$ 小鼠的胰岛素抵抗 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(11): 2010-2014.
- [23] 王超, 张会欣, 邢邯英, 等. 氧化苦参碱抑制炎症因子改善高脂喂养 ApoE $^{-/-}$ 小鼠胰岛素抵抗 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(6): 670-674.
- [24] Xie B, Liu X Y, Yang J, *et al.* PIAS1 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by stimulating PPAR γ SUMOylation [J]. *BMC Cell Biol*, 2018, 19(1): 24.
- [25] Heo K S, Chang E, Takei Y, *et al.* Phosphorylation of protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1) by MAPK-activated protein kinase-2 inhibits endothelial inflammation via increasing both PIAS1 transrepression and SUMO E3 ligase activity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(2): 321-329.
- [26] Liu B, Yang R, Wong K A, *et al.* Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(3): 1113-1123.
- [27] Ke H Z, Lee S, Kim J, *et al.* Interaction of PIAS1 with PRRS virus nucleocapsid protein mediates NF- κ B activation and triggers proinflammatory mediators during viral infection [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11042.
- [28] Leita B B, Jones M C, Brosens J J. The SUMO E3-ligase PIAS1 couples reactive oxygen species-dependent JNK activation to oxidative cell death [J]. *Faseb J*, 2011, 25(10): 3416-3425.

[责任编辑 李亚楠]