

网络出版时间: 2020-9-8 11:02 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200903.1448.014.html>

◇ 药学研究 ◇

## 芍药苷-6'-O-苯磺酸酯对胰岛素抵抗 HASMC 作用及机制

苏扬妮, 黄琼芳, 赵天娇, 黄琼, 魏伟

**摘要** 目的 探讨芍药苷-6'-O-苯磺酸酯(CP-25)对胰岛素抵抗人主动脉平滑肌细胞(HASMC)的作用及部分机制。方法 1  $\mu\text{mol/L}$  胰岛素诱导建立胰岛素抵抗 HASMC 模型; 葡萄糖氧化酶法检测 CP-25 对胰岛素抵抗 HASMC 葡萄糖消耗量的影响; CCK-8 法、Transwell、流式细胞术检测细胞的增殖、迁移和凋亡变化; Western blot 法测定 G 蛋白偶联受体激酶 2(GRK2)、胰岛素受体(INSR)、磷酸化胰岛素受体底物(p-IRS)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)和葡萄糖转运体 4(GLUT4)的表达; 免疫共沉淀法测定 GRK2 与 INSR、GRK2 与 p-IRS 的相互作用。结果 与胰岛素模型组相比, CP-25 可增加 HASMC 的葡萄糖消耗, 抑制其异常增殖和迁移、促进凋亡; 1  $\mu\text{mol/L}$  胰岛素作用细胞后, CP-25 下调胰岛素所致的 GRK2 的胞膜表达增高, 上调 IR-HASMC 时 INSR、p-IRS、PI3K 的表达和 GLUT4 的胞膜表达; CP-25 下调 IR-HASMC 时增高的 GRK2 与 INSR、GRK2 与 p-IRS 的共表达。结论 CP-25 可能通过抑制 GRK2 的膜转位和表达水平, 促进 INSR/IRS/PI3K/GLUT4 信号通路的活化, 改善 HASMC 的胰岛素抵抗。

**关键词** 芍药苷-6'-O-苯磺酸酯; 胰岛素抵抗; 人主动脉平滑肌细胞; G 蛋白偶联受体激酶 2; 胰岛素信号通路

中图分类号 R 965; R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1550-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.014

2 型糖尿病(type 2 diabetes, T2D)是一种代谢性疾病,其主要标志是胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)<sup>[1]</sup>。糖尿病易引起心血管系统并发症。研究<sup>[2]</sup>表明血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)从中膜向内膜迁移对糖尿病血管动脉

粥样硬化的发展至关重要。G 蛋白偶联受体激酶 2(G-protein-coupled receptor kinase 2, GRK2)是调控 G 蛋白偶联受体快速失敏相关的激酶。GRK2 水平上调会改变胰岛素信号转导, IR 时 GRK2 表达增高<sup>[3]</sup>。前期研究<sup>[4]</sup>表明芍药苷-6'-O-苯磺酸酯(paeoniflorin-6'-O-benzenesulfonate, CP-25)可以抑制 GRK2 的活性和表达。CP-25 能否通过调节 GRK2 影响平滑肌细胞中胰岛素受体(insulin receptor, INSR)信号和功能目前尚不清楚。该文通过培养人主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cell, HASMC)观察 CP-25 能否通过调控 GRK2 及下游胰岛素信号通路影响 IR-HASMC 的功能, 及对 INSR 与 GRK2 相互作用的影响, 为糖尿病临床治疗药物的拓展提供新的方向。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 细胞** HASMC 在倒置显微镜下可见细胞呈长梭形, 有多个突起, 呈“峰谷状”生长。免疫荧光染色可见大量 VSMC 特异性的  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SM-actin)表达, 经鉴定证明细胞为 HASMC。来源于上海细胞库, 由湘雅医学院馈赠。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 人胰岛素(美国 Sigma 公司); 盐酸二甲双胍(上海 MACKLIN 公司); CP-25 纯度  $\geq 98\%$  (安徽医科大学临床药理研究所化学室); 无酚红 DMEM 培养基(上海 Gibco 公司); 葡萄糖测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); 细胞凋亡荧光 Hoechst 33342/PI 双染试剂盒(北京 Solarbio 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国贝博公司); ECL 发光显色试剂盒(上海 Thermo Scientific 公司); GRK2 抗体(美国 CST 公司); INSR 抗体(武汉 Proteintech 公司); GLUT4 抗体(美国 Affinity 公司); DYY-7C 型电泳系统(北京六一生物科技有限公司); Image Quant LAS 4000 荧光及化学发光成像系统(美国 GE 公司); Bio Tek Elx  $\times$  808 酶标仪(美国 Bio Tek 公司); BX-50 型正置显微镜(日本 OLYMPUS 公司); DM11 型倒置式显微镜(德国徕卡公

2020-05-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81974508, 81673492)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 苏扬妮, 女, 硕士研究生;

黄琼, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: qionghuang@126.com;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

司); FC500 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 IR 模型的建立** 取对数生长期细胞接种到 6 孔板 培养 12 h 贴壁后, 更换终浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  的胰岛素培养液 培养 24 h 建立 IR-HASMC 模型。

**1.2.2 葡萄糖消耗量的检测** 按  $6 \times 10^3$ /孔接种到 96 孔板 12 h 后, 设置空白对照组、胰岛素组 ( $1 \mu\text{mol/L}$ )、胰岛素 ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) + 不同浓度的 CP-25 ( $1 \text{ nmol/L}$ 、 $10 \text{ nmol/L}$ 、 $100 \text{ nmol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ ) 组、胰岛素 ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) + 二甲双胍 ( $3 \text{ mmol/L}$ ) 组, 按照上述分组每孔加  $200 \mu\text{l}$  培养基培养 24 h 后全部更换为无酚红 DMEM 培养基继续培养 24 h, 取上清液用葡萄糖试剂盒测各孔葡萄糖浓度, 以空白对照组葡萄糖含量均值减去各孔测得葡萄糖含量计算各孔的葡萄糖消耗量<sup>[5]</sup>。

**1.2.3 增殖检测** 按  $6 \times 10^3$ /孔接种到 96 孔板 12 h 后, 更换为含 1% 胎牛血清培养基处理 24 h, 同 1.2.2 项分组继续培养 24 h, 于终止培养前 2 h 每孔加  $10 \mu\text{l}$  CCK-8 试剂, 避光继续孵育 1~2 h 后于酶标仪读取  $A_{450}$  值。

**1.2.4 迁移检测** 按  $6 \times 10^3$ /室接种到 transwell 小室内, 同 1.2.2 项分组加入培养基, 每孔终体积  $600 \mu\text{l}$ 。24 h 后取出小室, 结晶紫染色 15 min, 洗涤后棉签擦拭, 于显微镜下观察拍照 4 倍镜统计迁移细胞数。

**1.2.5 凋亡检测** 按  $1 \times 10^5$ /孔接种到 6 孔板内, 12 h 后, 同 1.2.2 项分组, 继续培养 24 h, 每孔加  $200 \mu\text{l}$  无 EDTA 消化液, 收集细胞, 按凋亡试剂盒说明书操作。

**1.2.6 蛋白表达检测** Western blot 法检测 GRK2 和葡萄糖转运体 4 (glucose transporter 4 GLUT4) 的胞膜表达和 INSR、磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide-3-kinase, PI3K)、胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 和磷酸化胰岛素受体底物 (phosphorylated insulin receptor substrate, p-IRS) 的细胞表达。按  $1 \times 10^5$ /孔接种到 6 孔板 12 h 后, 设置空白对照组、胰岛素组 ( $1 \mu\text{mol/L}$ )、胰岛素 ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) + 不同浓度的 CP-25 ( $100 \text{ nmol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ ) 组和胰岛素 ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) + 二甲双胍 ( $3 \text{ mmol/L}$ ) 组, 其中检测 GRK2 蛋白的胞膜表达时不设二甲双胍组 培养 24 h 后, 弃培养基 PBS 洗涤, 加裂解液 (RIPA : PMSF = 99 : 1), 冰孵 30 min 后移至 EP 管中,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冻存后置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  融化, 重复 3 次后以  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、

$10\ 400 \text{ r/min}$  离心 15 min, 上清液为总蛋白。转移至离心管  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $100\ 000 \text{ r/min}$  超速离心 60 min, 沉淀物为胞膜蛋白。加裂解液溶解胞膜, 移入 EP 管中进行 BCA 定量, 加蛋白上样缓冲液 (蛋白样品 : 蛋白上样缓冲液 = 4 : 1),  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  加热 8 min, SDS-PAGE 电泳分离蛋白后转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入适当比例的一抗  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗膜后加入 HRP 标记的二抗  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 2 h 后 ECL 发光, 暗室中显影和定影, 总蛋白和胞膜蛋白分别以  $\beta$ -actin 和 ATP1A1 作为内参对照。

**1.2.7 免疫共沉淀 (CO-immunoprecipitation, CO-IP) 检测蛋白相互作用** 按  $1 \times 10^5$ /孔接种到 6 孔板 12 h 后, 设置空白对照组、胰岛素组 ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) 和胰岛素 ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) + CP-25 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 组 24 h 后收集总蛋白, 离心收集上清液, 留取 1/10 体积做 input; 耦联抗体后, 按 Western blot 法检测 GRK2 与 INSR、GRK2 与 p-IRS 的共表达情况。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间差异比较采用两样本  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CP-25 对 IR-HASMC 葡萄糖消耗的影响** 为观察不同浓度 CP-25 处理细胞对其葡萄糖消耗量的影响, 采用葡萄糖氧化酶测定法检测细胞的葡萄糖消耗情况。与空白对照组比较,  $1 \mu\text{mol/L}$  胰岛素处理组可降低细胞的葡萄糖消耗量, 与胰岛素组比较, 胰岛素 + CP-25 ( $10 \text{ nmol/L}$ 、 $100 \text{ nmol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ ) 组均可提高细胞的葡萄糖消耗量, 差异有统计学意义 ( $F = 7.71$   $P < 0.01$ )。见图 1。

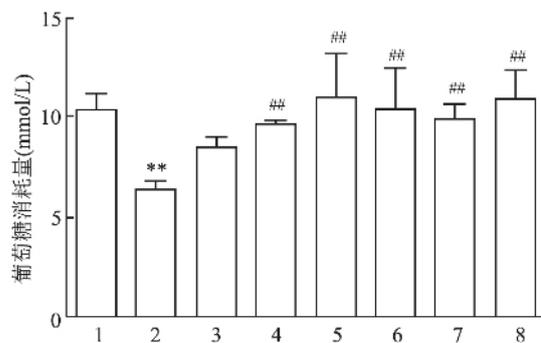


图1 不同浓度 CP-25 处理对 IR-HASMC 葡萄糖消耗的影响

1: 空白对照组; 2: 胰岛素组; 3: 胰岛素 + CP-25 ( $1 \text{ nmol/L}$ ); 4: 胰岛素 + CP-25 ( $10 \text{ nmol/L}$ ); 5: 胰岛素 + CP-25 ( $100 \text{ nmol/L}$ ); 6: 胰岛素 + CP-25 ( $1 \mu\text{mol/L}$ ); 7: 胰岛素 + CP-25 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ); 8: 胰岛素 + 二甲双胍; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与胰岛素组比较: ##  $P < 0.01$

**2.2 CP-25 对 IR-HASMC 增殖、迁移及凋亡的影响** 为观察不同浓度 CP-25 处理对细胞基本功能的影响,依次采用 CCK-8 法、Transwell 和流式细胞术检测细胞的增殖、迁移和凋亡情况。CCK-8 结果表明:与空白对照组比较,1 μmol/L 胰岛素组可以促进细胞的增殖;与胰岛素处理组比较,胰岛素 + CP-25(1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L) 处理组均能抑制细胞的异常增殖,差异有统计学意义( $F = 90.975, P < 0.01$ )。见图 2。采用 Transwell 法检测 CP-25 对细胞迁移功能的影响,结果表明:与空白对照组比较,1 μmol/L 胰岛素组促进细胞的迁移;与胰岛素组比较,胰岛素 + CP-25(1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L) 处理组均可以抑制细胞的异常迁移,差异有统计学意义( $F = 114.265, P < 0.01$ )。见图 3。运用流式细胞术检测不同浓度 CP-25 对细胞凋亡的影响情况。结果表明:与空白对照组比较,1 μmol/L 胰岛素处理组可以降低细胞的凋亡率;与胰岛素处理组比较,胰岛素 + CP-25(1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L) 处理组均可提高细胞的凋亡率,差异有统计学意义( $F = 932.772, P < 0.01$ )。见图 4。

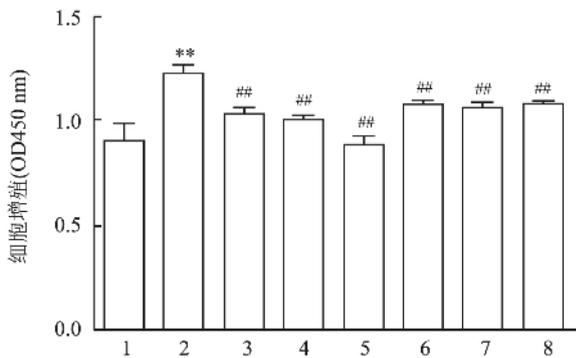


图 2 不同浓度 CP-25 处理对 IR-HASMC 增殖的影响

1: 空白对照组; 2: 胰岛素组; 3: 胰岛素 + CP-25(1 nmol/L); 4: 胰岛素 + CP-25(10 nmol/L); 5: 胰岛素 + CP-25(100 nmol/L); 6: 胰岛素 + CP-25(1 μmol/L); 7: 胰岛素 + CP-25(10 μmol/L); 8: 胰岛素 + 二甲双胍; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与胰岛素组比较: ##  $P < 0.01$

**2.3 CP-25 对 IR-HASMC GRK2 胞膜表达的影响** 为探讨 CP-25 影响细胞功能的分子机制,首先采用 Western blot 法检测细胞中 GRK2 蛋白的胞膜表达,结果表明:与空白对照组比较,1 μmol/L 胰岛素作用细胞后,GRK2 的胞膜表达水平增高;与胰岛素组比较,胰岛素 + CP-25(100 nmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L) 处理组均可下调 GRK2 的胞膜表达,差异

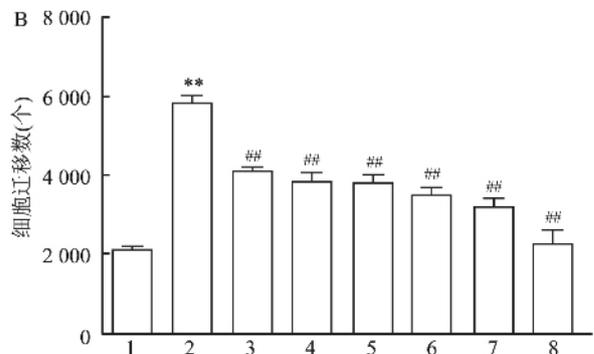
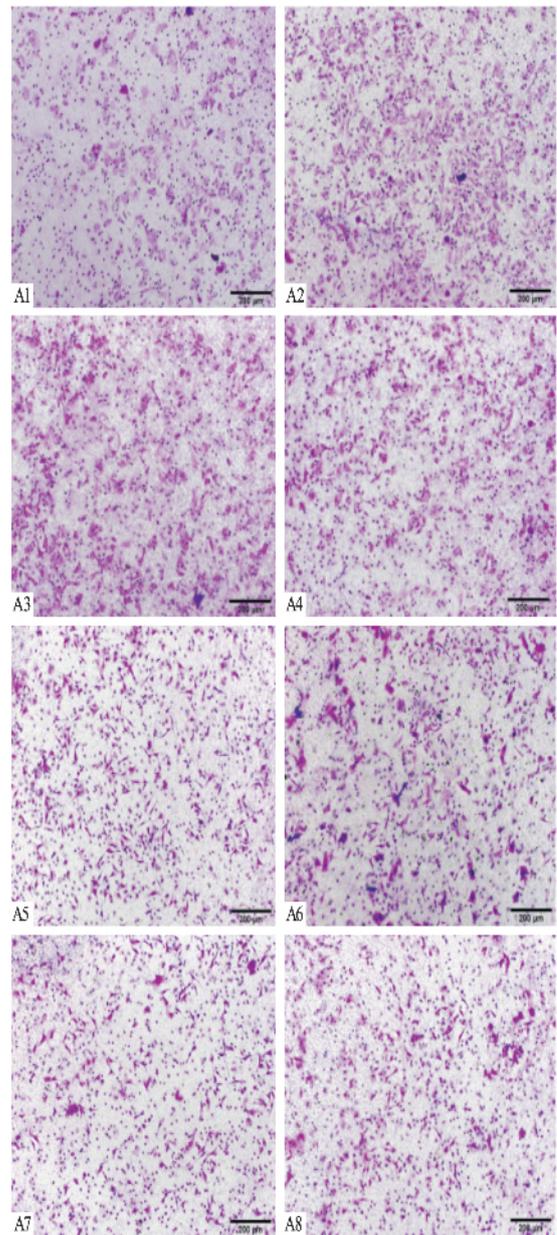


图 3 不同浓度 CP-25 处理对 IR-HASMC 迁移的影响

A: 不同组别细胞迁移图 transwell ×10; B: 细胞迁移个数; 1: 空白对照组; 2: 胰岛素组; 3: 胰岛素 + CP-25(1 nmol/L); 4: 胰岛素 + CP-25(10 nmol/L); 5: 胰岛素 + CP-25(100 nmol/L); 6: 胰岛素 + CP-25(1 μmol/L); 7: 胰岛素 + CP-25(10 μmol/L); 8: 胰岛素 + 二甲双胍; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与胰岛素组比较: ##  $P < 0.01$

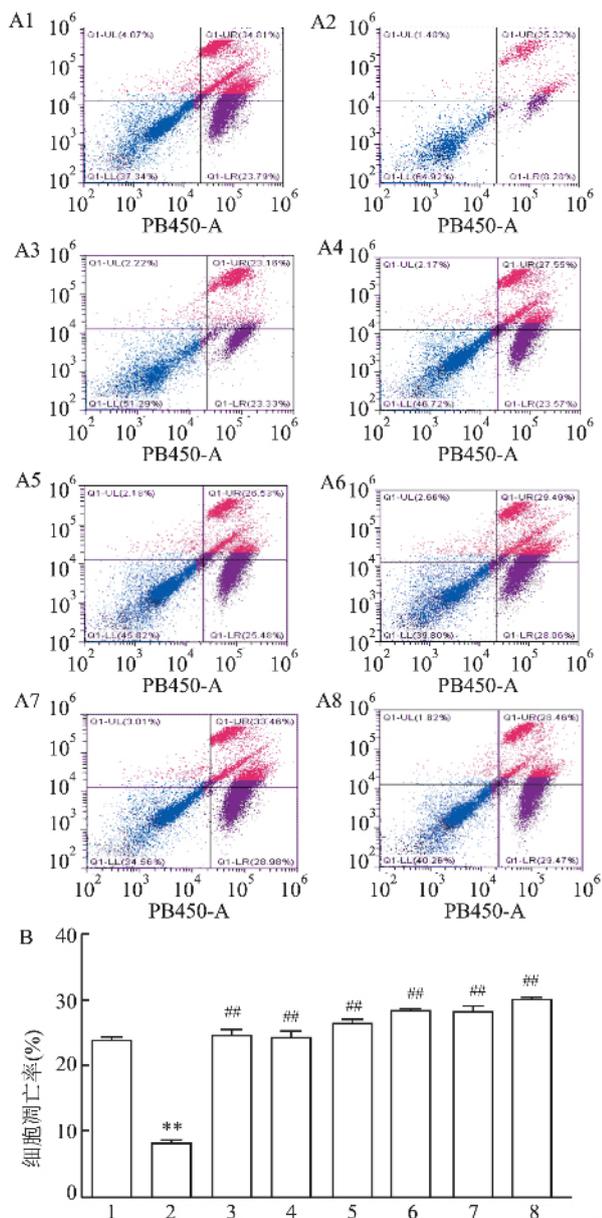


图4 不同浓度 CP-25 处理对 IR-HASMC 凋亡的影响

A: 不同组别细胞凋亡图; B: 细胞凋亡率; 1: 空白对照组; 2: 胰岛素组; 3: 胰岛素 + CP-25 (1 nmol/L); 4: 胰岛素 + CP-25 (10 nmol/L); 5: 胰岛素 + CP-25 (100 nmol/L); 6: 胰岛素 + CP-25 (1 μmol/L); 7: 胰岛素 + CP-25 (10 μmol/L); 8: 胰岛素 + 二甲双胍; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与胰岛素组比较: ##  $P < 0.01$

有统计学意义 ( $F = 848.188, P < 0.01$ )。见图 5。

**2.4 CP-25 对 IR-HASMC GLUT4 胞膜表达水平、INSR、PI3K、IRS 和 p-IRS 表达水平的影响** Western blot 进一步检测 CP-25 对细胞中关键蛋白 GLUT4 膜表达的影响, 结果表明: 与空白对照组比较, 1 μmol/L 胰岛素处理细胞后, GLUT4 蛋白的胞膜表达减少, 与胰岛素组比较, 胰岛素 + CP-25 (1 μmol/L, 10 μmol/L) 处理组可上调 GLUT4 的胞

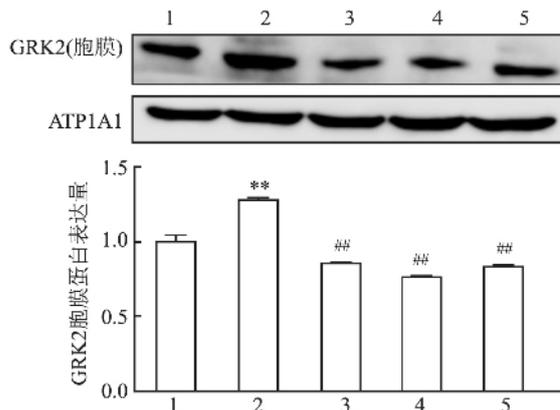


图5 不同浓度 CP-25 处理对 IR-HASMC 中 GRK2 胞膜表达的影响

1: 空白对照组; 2: 胰岛素组; 3: 胰岛素 + CP-25 (100 nmol/L); 4: 胰岛素 + CP-25 (1 μmol/L); 5: 胰岛素 + CP-25 (10 μmol/L); 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与胰岛素组比较: ##  $P < 0.01$

膜表达水平, 差异有统计学意义 ( $F = 220.252, P < 0.01$ )。见图 6A。为进一步探讨 CP-25 对胰岛素信号通路相关蛋白的影响, Western blot 检测相关蛋白的表达水平。结果表明: 与空白对照组比较, 1 μmol/L 胰岛素处理细胞后, INSR 的表达下降; 与胰岛素组比较, 胰岛素 + CP-25 (100 nmol/L, 1 μmol/L, 10 μmol/L) 处理组均可上调 INSR 的表达, 差异有统计学意义 ( $F = 602.297, P < 0.01$ )。见图 6B。与空白对照组比较, 1 μmol/L 胰岛素组 PI3K 的蛋白表达水平下降, 与胰岛素处理组比较, 胰岛素 + CP-25 (100 nmol/L, 1 μmol/L, 10 μmol/L) 组均上调 PI3K 的表达, 差异有统计学意义 ( $F = 2.079E3, P < 0.01$ )。见图 6C。与空白对照组比较, 胰岛素处理组 IRS 的蛋白水平未发生变化。见图 6D。与空白对照组比较, 1 μmol/L 胰岛素作用组 p-IRS 的蛋白表达下降, 差异有统计学意义。与胰岛素组比较, 胰岛素 + CP-25 (100 nmol/L, 1 μmol/L, 10 μmol/L) 处理细胞后均上调 p-IRS 的蛋白表达, 差异有统计学意义 ( $F = 828.603, P < 0.01$ )。见图 6E。

**2.5 CP-25 对 IR-HASMC GRK2 与 INSR 和 GRK2 与 p-IRS 相互作用的影响** 为进一步探讨 CP-25 对 IR-HASMC 中 INSR 与 GRK2 相互作用的影响, 采用 CO-IP 法检测两种蛋白的相互作用, 结果表明: 与空白对照组比较, 1 μmol/L 胰岛素 (1.254 ± 0.008) 作用细胞后上调 GRK2 与 INSR 的共表达, 差异有统计学意义。与胰岛素组比较, 胰岛素 + CP-25 (10 μmol/L) 组 (0.944 ± 0.013) 下调两者的共表达, 差异有统计学意义 ( $F = 1.069E3, P < 0.01$ )。见图 7A。CO-IP 法检测 GRK2 与 p-IRS 的相互作用。结果表明: 与空白对照组比较, 1 μmol/L

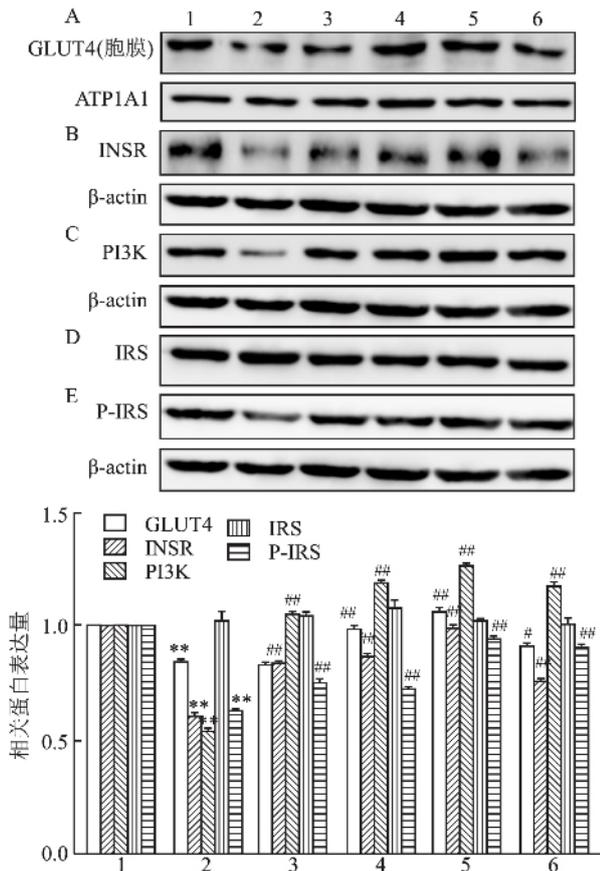


图6 不同浓度CP-25处理对IR-HASMC中GLUT4、INSR、PI3K、IRS和p-IRS表达的影响

A: GLUT4 胞膜蛋白表达情况; B: INSR 蛋白表达情况; C: PI3K 蛋白表达情况; D: IRS 蛋白表达情况; E: p-IRS 蛋白表达情况; 1: 空白对照组; 2: 胰岛素组; 3: 胰岛素 + CP-25 (100 nmol/L); 4: 胰岛素 + CP-25 (1 μmol/L); 5: 胰岛素 + CP-25 (10 μmol/L); 6: 胰岛素 + 二甲双胍; 与空白对照组比较: \*\* P < 0.01; 与胰岛素组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

胰岛素 (1.068 ± 0.006) 作用细胞后上调 GRK2 与 p-IRS 的共表达, 差异有统计学意义。与胰岛素处理组比较, 胰岛素 + CP-25 (10 μmol/L) 组 (0.919 ± 0.021) 可下调两者的共表达, 差异有统计学意义 (F = 106.239, P < 0.01)。见图 7B。

### 3 讨论

IR 是 T2D 的主要特征, 随着病程的进展, IR 逐渐在多种器官如肝脏、骨骼肌等中出现, 引发多种糖尿病并发症<sup>[6]</sup>。芍药苷 (paeoniflorin, Pae) 是白芍总苷 (total glucosides of paeony, TGP) 中的主要生物活性成分。研究<sup>[7]</sup>表明 TGP 和 Pae 均有抗炎免疫调节作用, Pae 具有抗氧化和抗高血糖等多种药理作用, 被广泛应用于糖尿病及其并发症如糖尿病肾病的治疗<sup>[8]</sup>。为了提高 Pae 的生物利用度, 课题组对

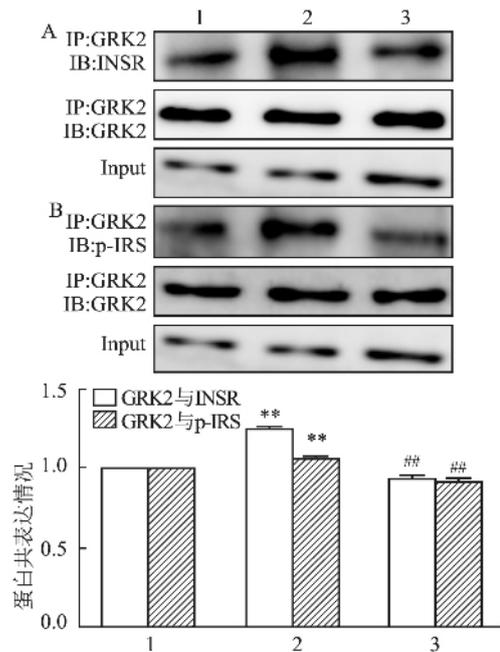


图7 CP-25处理对IR-HASMC中GRK2与INSR、GRK2与p-IRS共表达的影响

A: GRK2 与 INSR 的共表达情况; B: GRK2 与 p-IRS 的共表达情况; 1: 空白对照组; 2: 胰岛素组; 3: 胰岛素 + CP-25 (10 μmol/L); 与空白对照组比较: \*\* P < 0.01; 与胰岛素组比较: ## P < 0.01

Pae 进行结构修饰, 合成 Pae 的新型酯衍生物 CP-25<sup>[9]</sup>。文献<sup>[10]</sup>报道, GRK2 的表达受胰岛素的调节, 这提示 GRK2 水平或活性增加参与 IR 的发生发展。此外, GRK2 水平增加抑制葡萄糖的摄取和胰岛素的信号转导, 提示改变 GRK2 的水平和活性可影响胰岛素信号的传递<sup>[11]</sup>。因此, GRK2 可作为抗糖尿病药物的新靶点。

本研究采用 1 μmol/L 胰岛素成功建立 IR-HASMC 模型, 并给予不同浓度的 CP-25 干预, 结果显示 CP-25 可以有效地增加 IR 细胞的葡萄糖消耗量。在高浓度胰岛素作用细胞时, 细胞出现异常增殖和迁移、凋亡率下降, 而 CP-25 作用细胞后, 细胞的增殖和迁移受到抑制, 凋亡率增加。为了探讨 CP-25 改善 IR-HASMC 功能的分子机制, 首先采用 Western blot 法检测 GRK2 的蛋白表达。结果显示, 在 1 μmol/L 胰岛素作用下, GRK2 的胞膜表达水平较空白对照组升高, 不同浓度的 CP-25 均可以降低 GRK2 的胞膜表达。运用 Western blot 进一步检测胰岛素信号中相关蛋白的表达水平, 结果显示 CP-25 可增加 GLUT4 的膜表达水平, 上调 INSR、p-IRS 和 PI3K 的蛋白表达, 推测 CP-25 可能通过下调 GRK2 的膜表达水平和上调 INSR/p-IRS/PI3K/GLUT4 蛋白的表达, 促进胰岛素信号通路的活化,

改善 IR-HASMC 的功能。采用 CO-IP 法进一步观察 GRK2 与 INSR、GRK2 与 p-IRS 的共表达情况。结果显示 HASMC 发生 IR 时, GRK2 与 INSR 共表达增强, 可能与 INSR 脱敏和 GRK2 过度转膜有关; 同样地, 胰岛素作用细胞后增强 GRK2 与 p-IRS 的共表达, 表明 GRK2 表达增加可以抑制 p-IRS 的水平, 进而使胰岛素信号通路的转导受到抑制, HASMC 的增殖和迁移增加。而 CP-25 作用细胞后可下调 GRK2 与 INSR、GRK2 与 p-IRS 的共表达, 表明 CP-25 通过抑制 GRK2 的膜转位和 GRK2 的胞膜表达水平, 促进胰岛素信号通路的活化, 可能是其抑制 IR-HASMC 异常增殖和迁移的机制之一。

### 参考文献

- [1] Prasad M, Chen E W, Toh S A, et al. Autoimmune responses and inflammation in type 2 diabetes [J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 107(1): 1-10.
- [2] Xiang M, Yang R, Zhang Y, et al. Effect of crocetin on vascular smooth muscle cells migration induced by advanced glycosylation end products [J]. *Microvasc Res* 2017, 112: 30-6.
- [3] Guccione M, Ettari R, Taliani S, et al. G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) inhibitors: current trends and future perspectives [J]. *J Med Chem* 2016, 59(20): 9277-94.
- [4] Jia X Y, Chang Y, Wei F, et al. CP-25 reverses prostaglandin E4 receptor desensitization-induced fibroblast-like synoviocyte dysfunction *via* the G protein-coupled receptor kinase 2 in autoimmune arthritis [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2019, 40(8): 1029-39.
- [5] 蔡双朋, 李俊, 黄成, 等. 丹参酮 I 对 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用及机制的研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2016, 51(7): 974-7.
- [6] Paneni F, Costantino S. Insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk [J]. *Curr Atheroscler Rep* 2014, 16(7): 419.
- [7] Chen J, Wang Y, Wu H, et al. A modified compound from paeoniflorin, CP-25, suppressed immune responses and synovium inflammation in collagen-induced arthritis mice [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 563.
- [8] 武鸿萍, 樊献俄, 李来伟, 等. 芍药苷降糖作用研究 [J]. *中南药学* 2017, 15(9): 1210-2.
- [9] Zhang F, Shu J L, Li Y, et al. CP-25, a novel anti-inflammatory and immunomodulatory drug, inhibits the functions of activated human B cells through regulating BAFF and TNF-alpha signaling and comparative efficacy with biological agents [J]. *Front Pharmacol* 2017, 8: 933.
- [10] Taguchi K, Hida M, Hasegawa M, et al. Suppression of GRK2 expression reduces endothelial dysfunction by restoring glucose homeostasis [J]. *Sci Rep* 2017, 7(1): 8436.
- [11] Taguchi K, Matsumoto T, Kobayashi T. G-protein-coupled receptor kinase 2 and endothelial dysfunction: molecular insights and pathophysiological mechanisms [J]. *J Smooth Muscle Res* 2015, 51: 37-49.

## Effect of paeoniflorin-6'-O-benzenesulfonate on HASMC with insulin resistance

Su Yangni, Huang Qiongfang, Zhao Tianjiao, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicines, Hefei 230032*)

**Abstract Objective** To explore effect and mechanism of paeoniflorin-6'-O-benzenesulfonate (CP-25) on human aortic smooth muscle cell (HASMC) with insulin resistance (IR). **Methods** IR-HASMC was induced by 1  $\mu\text{mol/L}$  insulin. We detected glucose consumption by glucose consumption assay kit. Cell proliferation, migration and apoptosis were detected by CCK-8, transwell and flow cytometry method respectively. The protein expression of GRK2, INSR, p-IRS, PI3K and GLUT4 were determined by Western blot. The co-expressions of GRK2 and INSR, GRK2 and p-IRS were determined by co-immunoprecipitation. **Results** CP-25 increased the glucose consumption in IR-HASMC. CP-25 also inhibited abnormal proliferation and migration of cells, and promoted cell apoptosis. CP-25 down-regulated membrane expression of GRK2, up-regulated the expression of INSR, p-IRS, PI3K and membrane expression of GLUT4. The co-expressions of GRK2 and INSR, GRK2 and p-IRS could be reduced by CP-25. **Conclusion** CP-25 can improve IR in HASMC, in which it inhibits the membrane translocation and expression of GRK2 and promotes activation of INSR/IRS/PI3K/GLUT4 signaling pathway.

**Key words** paeoniflorin-6'-O-benzenesulfonate; insulin resistance; human aortic smooth muscle cell; G-protein-coupled receptor kinase 2; insulin signaling pathway