

· 药理 ·

桂皮醛经 JAK2/STAT3 通路抑制 VEGF 诱导的内皮细胞增殖、迁移及成管

陈明霞^{1,2}, 刘建勋¹, 武曲星¹, 王攀¹, 连增林², 刘晔², 李志刚², 任钧国^{1*}

(1. 中国中医科学院 西苑医院 基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091;
2. 北京汉典制药有限公司 中药研究所, 北京 100103)

[摘要] 目的:为探讨桂皮醛对糖尿病视网膜病变新生血管的作用及机制,观察了桂皮醛对血管内皮生长因子(VEGF)诱导 EA.hy926 细胞增殖、迁移、成管以及 Janus 激酶 2/信号传导与转录激活因子 3(JAK2/STAT3)通路的影响。方法:将 EA.hy926 细胞分成空白组、模型组(7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ VEGF),VEGF + 桂皮醛(60,90,120,150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,分别采用噻唑蓝(MTT)比色法和划痕实验检测桂皮醛对 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞增殖和迁移作用的影响;将 EA.hy 926 细胞分成空白组,模型组(7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ VEGF),VEGF + 桂皮醛(90,150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,采用管腔形成实验检测桂皮醛对 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞成管作用的影响;将 EA.hy 926 细胞分成空白组,模型组(7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ VEGF),VEGF + AG490(50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,VEGF + 桂皮醛(90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,VEGF + 桂皮醛(150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,VEGF + 桂皮醛(150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + AG490(50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测桂皮醛对 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞 JAK2/STAT3 通路的影响。结果:与空白组比较,模型组能够显著地促进 EA.hy 926 细胞增殖和迁移($P < 0.01$)。与模型组比较,桂皮醛(60,90,120,150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组能显著抑制 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞的增殖和迁移($P < 0.01$)。与空白组比较,VEGF 对 EA.hy 926 细胞成管具有一定的促进作用,成管的节点数、交叉点数、网眼数和血管分支数均有增加,但无统计学差异。与模型组比较,桂皮醛(90,150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组对成管的节点数、交叉点数和网眼数均有明显抑制作用($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较,模型组 p-JAK2, p-STAT3, STAT3 蛋白表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,桂皮醛(150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能够显著抑制 VEGF 引起的 p-JAK2, p-STAT3, STAT3 蛋白表达升高($P < 0.01$),桂皮醛(90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能够显著抑制 VEGF 引起的 p-STAT3, STAT3 蛋白表达升高($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:桂皮醛对 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞的增殖、迁移、成管具有明显的抑制作用,该作用与抑制 JAK2/STAT3 通路的激活有关。

[关键词] 桂皮醛; 血管内皮生长因子(VEGF); EA.hy 926 细胞; 增殖; 迁移; 成管; Janus 激酶 2/信号传导与转录激活因子 3 (JAK2/STAT3) 通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)08-0028-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190704

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181217.0955.003.html>

[网络出版时间] 2018-12-18 13:29

Inhibitory Effect of Cinnamaldehyde on Proliferation, Migration and Tube Formation of VEGF-induced Endothelial Cells via JAK2/STAT3 Pathway

CHEN Ming-xia^{1,2}, LIU Jian-xun¹, WU Qu-xing¹, WANG Pan¹, LIAN Zeng-lin²,
LIU Ye², LI Zhi-gang², REN Jun-guo^{1*}

(1. Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing 100091, China;
2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing Han Dian Pharmaceutical Co. Ltd, Beijing 100103, China)

[收稿日期] 20180830(008)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301018);北京市科技计划“十病十药”中药专项(Z121102001112007)

[第一作者] 陈明霞,博士,中级工程师,从事中药新药研发工作,Tel: 010-56315029,E-mail: chenmingxia2003@126.com

[通信作者] *任钧国,博士生导师,研究员,从事中药药理学研究工作,Tel: 010-62835612,E-mail: reek2003@163.com

[Abstract] Objective: To investigate the effect and mechanism of cinnamaldehyde on the angiogenesis of diabetic retinopathy, and the effect of cinnamaldehyde on vascular endothelial growth factor (VEGF) induced proliferation, migration, tube formation and Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) pathway of EA. hy 926 cells were observed. **Method:** EA. hy 926 cells were divided into normal control group, model group ($7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ VEGF), and VEGF + cinnamaldehyde group ($60, 90, 120, 150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and scratch test were used to observe the effect of cinnamaldehyde on the proliferation and migration of EA. hy 926 cells induced by VEGF. EA. hy 926 cells were divided into normal control group, model group ($7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ VEGF), and VEGF + cinnamaldehyde group ($90, 150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The tube formation experiment was used to observe the effect of cinnamaldehyde on the tube formation of EA. hy 926 cells induced by VEGF. EA. hy 926 cells were divided into normal control group, model group ($7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ VEGF), VEGF + AG490 group ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), VEGF + cinnamaldehyde group ($90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), VEGF + cinnamaldehyde group ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and VEGF + cinnamaldehyde group ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + AG490 group ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Western Blot method was used to explore the effect of cinnamaldehyde on the JAK2/STAT3 signaling pathway in EA. hy 926 cells induced by VEGF. **Result:** Compared with the control group, model group obviously promoted the proliferation and migration of EA. hy 926 cells ($P < 0.01$). Compared with the model group, cinnamaldehyde ($60, 90, 120, 150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly suppressed VEGF-induced proliferation and migration of EA. hy 926 cells ($P < 0.01$). Compared with the control group, VEGF group could promote the tube formation of EA. hy 926 cells. The number of nodes, junctions, meshes and vascular branches were increased, but with no statistical difference. Compared with the model group, cinnamaldehyde ($90, 150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) showed an obvious inhibitory effect on the number of nodes, junctions and meshes of tubules ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with the control group, the expressions of p-JAK2, p-STAT3, and STAT3 in the model group were significantly increased ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with the model group, Cinnamaldehyde ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly reduced the expressions of P-JAK2, P-STAT3, STAT3 proteins ($P < 0.01$). Cinnamaldehyde ($90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) obviously reduced the expressions of p-STAT3 and STAT3 proteins ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Cinnamaldehyde showed a significantly inhibitory effect on the proliferation, migration and tube formation of VEGF-induced EA. hy 926 cells, which was related to the inhibition of the activation of JAK2/STAT3 pathway.

[Key words] cinnamaldehyde; vascular endothelial growth factor (VEGF); EA. hy 926 cells; proliferation; migration; tube formation; Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) pathway

糖尿病视网膜病变 (DR) 是一种最为常见和严重的糖尿病并发症之一, 在临床上可分为非增殖期和增殖期, 其中增殖期以新生血管为主要特征。视网膜新生血管与正常血管不同, 血管壁缺乏紧密连接, 血浆可以通过血管壁渗漏至视网膜内及玻璃体腔, 破坏视网膜内环境的稳定性, 诱导玻璃体液化、变性、增殖收缩, 进而导致牵拉性的视网膜脱离而严重损害视力^[1]。这是导致糖尿病患者失明的主要原因, 同时也是临床面临的主要挑战。

糖网明目颗粒来源于我国著名中医眼科专家高健生教授的临床经验方“密蒙花方”, 由黄芪片、乌梅、黄连片、肉桂、益母草、女贞子、密蒙花等中药组成, 具有益气养阴, 滋补肝肾, 化瘀通络, 和血明目之功效, 主要用于糖尿病视网膜病变的治疗, 在临床上取得了较好的疗效^[2-6]。前期研究发现, 糖网明目

颗粒对高脂喂养联合链脲佐霉素 (STZ) 诱导的 2 型糖尿病大鼠模型的视网膜新生血管具有一定的抑制作用^[7]。

桂皮醛是糖网明目颗粒方中肉桂挥发油的主要成分, 现代药理学研究表明, 其具有抗炎、解热镇痛、抗肿瘤、抗菌、降糖、抗肥胖等多种药理活性^[8]。近些年, 桂皮醛、肉桂以及肉桂组成的复方在降血糖方面的应用越来越广泛。黄链莎等^[9]研究发现桂皮醛具有降低糖尿病小鼠血糖的作用。李秋霞等^[10]研究发现肉桂与黄连、葛根组成的葛根交泰丸能够明显降低 2 型糖尿病大鼠的血脂及血糖水平, 增加大鼠体质量。但桂皮醛是否为糖网明目颗粒中抑制新生血管的活性成分之一, 以及相关的作用机制, 目前尚不明确, 也未见相关文献报道。根据桂皮醛具有抗肿瘤活性, 肿瘤的生长依赖于新生血管的形成,

推测桂皮醛可能具有抑制新生血管的活性。为此, 本文采用血管内皮生长因子(VEGF)诱导 EA.hy 926 细胞, 研究了桂皮醛对细胞增殖、迁移、成管作用的影响, 并对其作用机制进行了探讨, 结果显示桂皮醛能够明显抑制细胞增殖、迁移和新生血管的形成, 提示桂皮醛可能对 DR, 肿瘤等血管新生相关疾病具有一定的防治作用, 同时也为进一步揭示糖尿病明目颗粒治疗 DR 的作用机制提供了实验依据。

1 材料

1.1 药物与细胞 桂皮醛对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 10710-201217); EA.hy 926 细胞(购自中国科学院上海细胞库)。

1.2 试剂 胎牛血清(FBS), 高糖 DMEM 培养液, 0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司, 批号分别为 SV30087.02, SH30243.01, SH30042.01); 青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司, 批号 P1400-100); 二甲基亚砜(DMSO), 噻唑蓝(MTT)(美国 Amresco 公司, 批号分别为 0231, 0793-1g); Matrigel 基质胶(美国 Corning 公司, 批号 354253); 重组人 VEGF165(美国 Peprotech 公司, 批号 121610-1); 磷酸化 Janus 激酶 2/(p-JAK2), JAK2, 磷酸化信号传导与转录激活因子 3(p-STAT3), STAT3 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 3776, 3230, 9145, 4904); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 TA-09); 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(美国 Jackson 公司, 批号 111-035-003)。

1.3 仪器 YT-CJ-2ND 型超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司); MCO-175 型二氧化碳培养箱(日本 SANYO 公司); BDS200 型倒置相差显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司); MULTISKAN MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司); LXJ-II A 型离心机(上海安亭科学仪器厂); VE 180 型垂直电泳槽, VE 186 型转移电泳槽(上海天能科技有限公司); 脱 TS-2 型色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 EA.hy 926 细胞用高糖 DMEM 培养液(含 89% 高糖 DMEM 培养基, 10% 胎牛血清, 1% 青链霉素混合液)在 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, 每 3~4 d 传代 1 次, 以 1:3 分瓶传代, 期间换液 1 次, 收集对数生长期细胞用于实验。

2.2 MTT 比色法测定 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞增殖情况 取正常生长的细胞, 90% 融合时, 消化后

接种于 96 孔培养板(每孔 5×10^3 个细胞), 置细胞培养箱继续培养。培养 24 h 后吸净培养液, 进行分组, 分别为空白组, 模型组($7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ VEGF), VEGF + 桂皮醛($60, 90, 120, 150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组, DMSO 溶剂组; 每组 5 个复孔, 每孔加上述培养液 150 μL , 分别继续培养 24 h。每孔加 MTT 溶液($5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)20 μL , 于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内孵育 4 h。弃去培养液, 每孔加入 DMSO 100 μL , 室温振荡混匀 15 min。570 nm 处测定吸光度 A。计算抑制率, 抑制率 = $(A_{\text{空白孔}} - A_{\text{测量孔}}) / (A_{\text{空白孔}} - A_{\text{调零孔}}) \times 100\%$ 。

2.3 划痕实验检测 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞迁移作用 取正常生长的细胞, 90% 融合时, 消化后以每孔 1×10^6 个细胞的密度, 接种于 6 孔培养板(板底部背面用黑色笔上下画两条通过孔中心的平行线), 置细胞培养箱继续培养 24 h。弃去培养液, 用 10 μL 灭菌枪头每孔划出 3 条均匀平行的空痕(垂直于黑线), 加入磷酸盐缓冲液(PBS)清除空痕处细胞, 进行分组, 分别为空白组, 模型组($7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ VEGF), VEGF + 桂皮醛($60, 90, 120, 150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组, 根据分组分别更换不同的培养液(不含血清), 加培养液量为 2 mL, 继续培养 24 h。拍照, Image J 软件分析空痕面积。

2.4 管腔形成实验检测 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞成管作用 预先将 MatrigelTM Matrix 基质胶置于 4 °C 冰箱过夜冻融, 同时将无菌枪头和 96 孔板于 4 °C 冰箱预冷过夜。96 孔板中轻轻加入基质胶溶液 60 μL (冰上操作), 然后置于培养箱中 1 h, 使 Matrigel 与 Matrix 发生聚合反应, 凝固成层。将培养的 EA.hy 926 细胞以每孔 3×10^4 个细胞的密度, 接种于 96 孔板中, 分别设置空白组, 模型组($7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ VEGF), VEGF + 桂皮醛($90, 150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组, 每组设 3 个复孔, 加培养液量为 100 μL , 继续培养 8 h。拍照, 用 Image J 软件进行分析。

2.5 桂皮醛对 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞 JAK2/STAT3 通路的影响

2.5.1 细胞培养及蛋白收集 将 EA.hy 926 细胞接种于 25 cm² 培养瓶中, 每瓶 1×10^6 个细胞, 培养过夜后, 分成空白组, 模型组($7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ VEGF), VEGF + AG490($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组, VEGF + 桂皮醛($90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组, VEGF + 桂皮醛($150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组, VEGF + 桂皮醛($150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + AG490($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组。其中 VEGF + AG490 组, VEGF +

桂皮醛 ($90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, VEGF + 桂皮醛 ($150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, VEGF + 桂皮醛 ($150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + AG490 组分别采用 AG490, 桂皮醛 ($90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 桂皮醛 ($150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 桂皮醛 ($150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + AG490 对细胞进行预处理 1 h, 再加入 VEGF 继续培养。继续培养 15 min 后弃去培养液, 用预冷的 PBS 洗 4 次, 并尽量吸弃细胞培养瓶中残余的 PBS。将培养瓶置于冰上, 加裂解液 $100 \mu\text{L}$, 细胞刮刀和 Tip 头收集蛋白提取液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \times g$ 离心 10 min。取上清, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.5.2 BCA 法蛋白定量 按说明书操作, 测定蛋白浓度, 并调整质量浓度为 $0.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入 $5 \times$ 蛋白样品缓冲液, 煮沸 5 min。

2.5.3 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 p-JAK2, JAK2, p-STAT3, STAT3 蛋白表达 根据目的蛋白的相对分子质量, 配制分离胶, 浓缩胶体积分数为 5%。待检测蛋白样品上样量为 $18 \mu\text{g}/\text{孔}$ 。电泳条件为浓缩胶恒压 90 V, 约 20 min; 分离胶恒压 120 V, 通过预染蛋白 Marker 来确定电泳停止时间。转膜方法为湿转法, 300 mA 恒流, $0.45 \mu\text{m}$ 孔径 PVDF 膜, 转膜时间 90 min。将膜完全浸没于 5% 牛血清白蛋白-聚山梨酯 Tris 缓冲生理盐水 (BSA-TBST) 中, 水平摇床孵育 1 h。5% BSA-TBST 稀释一抗 (p-JAK2, JAK2, β -actin 均为 1:1 000, p-STAT3 和 STAT3 均为 1:2 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 水平摇床孵育过夜。次日, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。5% BSA-TBST 稀释二抗, 山羊抗兔 IgG (H + L) HRP 1:1 万, 室温孵育 40 min。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。ECL 滴加到膜的蛋白面, 反应 3 min, 曝光 2 min, 显影 2 min, 定影。图片扫描后, 并使用软件 Gel Image system ver 4.00 分析蛋白灰度值。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 桂皮醛对 VEGF 诱导 EA. hy 926 细胞增殖作用的影响 与空白组比较, DMSO 溶剂组无显著性差异, 认为使用 DMSO 溶解样品对实验结果无影响。与空白组比较, VEGF 刺激 24 h 能够显著地促进 EA. hy 926 细胞增殖 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 培养 24 h, 桂皮醛 ($60, 90, 120, 150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 4 个浓度组对 VEGF 诱导 EA. hy 926 细胞增殖均有显著抑制作用 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 桂皮醛对 VEGF 诱导 EA. hy 926 细胞增殖作用的影响

Table 1 Effect of cinnamaldehyde on proliferation of VEGF-induced EA. hy 926 cells

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$A(\bar{x} \pm s, n = 5)$	24 h 抑制率/%
调零孔	-	0.139 ± 0.002	-
空白	-	0.838 ± 0.018	-
模型	-	$0.890 \pm 0.009^{1)}$	-7.44
桂皮醛	150	$0.488 \pm 0.024^{2)}$	50.07
	120	$0.497 \pm 0.014^{2)}$	48.78
	90	$0.580 \pm 0.013^{2)}$	36.91
	60	$0.588 \pm 0.029^{2)}$	35.77
DMSO	-	0.841 ± 0.025	-0.43

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 桂皮醛对 VEGF 诱导 EA. hy 926 细胞迁移作用的影响 与空白组比较, VEGF 能够显著增加 EA. hy 926 细胞的伤口愈合率 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 桂皮醛 ($60, 90, 120, 150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 4 个浓度组对 VEGF 诱导 EA. hy 926 细胞的伤口愈合率均具有显著的抑制作用 ($P < 0.01$)。见表 2。

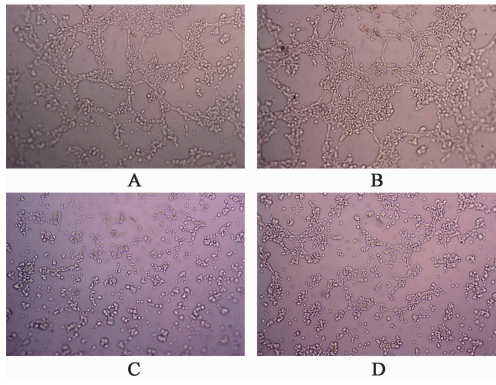
表 2 桂皮醛对 VEGF 诱导 EA. hy 926 细胞迁移作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of cinnamaldehyde on migration of VEGF-induced EA. hy 926 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h 伤口愈合率/%
空白	-	64.04 ± 1.72
模型	-	$78.50 \pm 4.23^{1)}$
桂皮醛	150	$31.99 \pm 9.23^{2)}$
	120	$42.89 \pm 3.29^{2)}$
	90	$61.90 \pm 4.47^{2)}$
	60	$63.80 \pm 4.95^{2)}$

3.3 桂皮醛对 VEGF 诱导 EA. hy 926 细胞成管作用的影响 空白组 EA. hy 926 细胞能够形成管腔状结构。与空白组比较, VEGF 对 EA. hy 926 细胞成管具有促进作用, 成管的节点数、交叉点数、网眼数和血管分支数均有增加, 但差异无统计学意义。与模型组比较, 桂皮醛 ($150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组对节点数、交叉点数、网眼数和血管分支数均有明显抑制作用 ($P < 0.01$), 几乎无完整的管腔形成; 桂皮醛 ($90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组对节点数、交叉点数和网眼数有明显抑制作用 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1, 表 3。

3.4 桂皮醛对 VEGF 诱导 EA. hy 926 细胞 JAK2/STAT3 信号通路的影响 与空白组比较, 模型组



A. 空白组; B. 模型组; C. 桂皮醛 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. 桂皮醛 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 1 桂皮醛对 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞成管作用的影响 ($\times 40$)
Fig. 1 Effect of cinnamaldehyde on tube formation of VEGF-induced EA.hy 926 cells ($\times 40$)

p-JAK2, p-STAT3, STAT3 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); AG490 作为 JAK2 特异性拮抗剂, 能够显著抑制 JAK2 和 STAT3 的磷酸化 ($P < 0.05, P < 0.01$), 从而抑制 VEGF 引起的 JAK2/STAT3

表 3 桂皮醛对 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞成管作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of cinnamaldehyde on tube formation of VEGF-induced EA.hy 926 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	节点	交叉点	网眼数	血管分支数
空白	-	70.0 \pm 21.4	21.0 \pm 6.6	7.3 \pm 4.0	10.0 \pm 3.5
模型	-	103.7 \pm 46.6	30.0 \pm 11.5	10.0 \pm 5.3	14.0 \pm 4.6
桂皮醛	150	6.0 \pm 5.6 ²⁾	1.7 \pm 1.5 ²⁾	0	3.0 \pm 2.6 ²⁾
	90	33.7 \pm 15.6 ¹⁾	9.3 \pm 4.0 ²⁾	1.0 \pm 1.0 ¹⁾	13.7 \pm 1.2

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

表 4 桂皮醛对 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞 JAK2/STAT3 通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of cinnamaldehyde on JAK2/STAT3 signaling pathway of VEGF-induced EA.hy 926 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

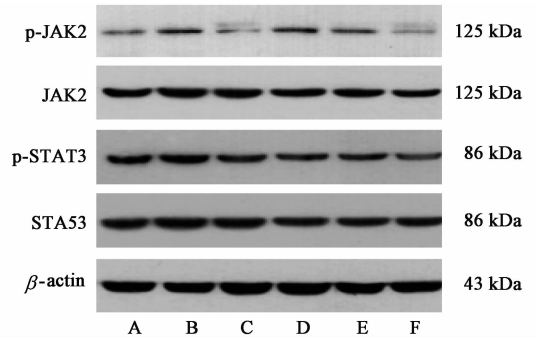
组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p-JAK2/ β -actin	JAK2/ β -actin	p-STAT3/ β -actin	STAT3/ β -actin
空白	-	0.298 \pm 0.016	0.401 \pm 0.012	0.385 \pm 0.049	0.819 \pm 0.103
模型	-	0.565 \pm 0.013 ²⁾	0.502 \pm 0.017	0.555 \pm 0.058 ²⁾	1.056 \pm 0.096 ¹⁾
AG490	-	0.369 \pm 0.038 ⁴⁾	0.505 \pm 0.073	0.463 \pm 0.041 ³⁾	0.906 \pm 0.111
桂皮醛	90	0.555 \pm 0.064	0.481 \pm 0.123	0.339 \pm 0.017 ⁴⁾	0.824 \pm 0.104 ³⁾
	150	0.465 \pm 0.048 ⁴⁾	0.416 \pm 0.015	0.339 \pm 0.016 ⁴⁾	0.653 \pm 0.103 ⁴⁾
桂皮醛 + AG490	150	0.341 \pm 0.031 ⁴⁾	0.391 \pm 0.054	0.309 \pm 0.026 ⁴⁾	0.615 \pm 0.066 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

EA.hy 926 细胞是 1983 年 Edgell 等将原代培养的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和 A549/8 细胞 (一株人源肺癌细胞的亚型) 相互融合而得到的永生人脐静脉内皮细胞系,既有内皮细胞的特性,又能无限传代,被广泛用于血管新生、炎症等相关疾病的研究中^[11]。VEGF 是目前发现最强的促血管生成因子^[12]。在 DR 增殖期,VEGF 能够诱导内皮细胞异常增殖,导致出现新生血管^[13]。游逸安等^[14]

信号通路激活;桂皮醛 ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能够显著抑制 VEGF 引起的 p-JAK2, p-STAT3, STAT3 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 桂皮醛 ($90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能够显著抑制 VEGF 引起的 p-STAT3, STAT3 蛋白表达升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 表 4。



A. 空白组; B. 模型组; C. AG490 组; D. 桂皮醛 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. 桂皮醛 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; F. 桂皮醛 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + AG490 组

图 2 各组 EA.hy 926 细胞 p-JAK2, JAK2, p-STAT3 与 STAT3 蛋白的表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of p-JAK2, JAK2, p-STAT3 and STAT3 protein expression in each group EA.hy 926 cells

研究发现,与正常组相比,增殖期 DR 患者血清 VEGF 含量显著升高,与玻璃体中 VEGF 含量呈正相关,VEGF 和新生血管的发生有密切关系。VEGF 与受体结合,可以激活多条下游信号通路^[15]。因此,本文选择了 EA.hy 926 细胞作为研究对象,采用 VEGF 诱导 EA.hy 926 细胞,研究了桂皮醛对细胞增殖、迁移、成管作用的影响,并进一步探讨了桂皮醛对 VEGF 引起的 JAK/STAT 信号通路激活的影响。

本文研究结果显示,桂皮醛(60, 90, 120, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 EA. hy 926 细胞的增殖、迁移具有明显的抑制作用。根据增殖和迁移实验结果,从中选择了两个浓度,进行了成管实验研究,结果表明,桂皮醛(90, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 VEGF 诱导 EA. hy 926 细胞的管腔形成具有明显的抑制作用。而韩琳^[16]研究结果显示,肉桂醛在 0.1, 0.5, 1, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时均可显著诱导 HUVECs 增殖、损伤愈合、迁移以及管腔形成,并呈现量效关系,与本实验研究结果截然相反。石鑫超等^[17]研究不同浓度桂皮醛对人膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)滑膜成纤维细胞的影响,发现中、高浓度桂皮醛作用 24, 48, 72 h, 能明显抑制人 KOA 滑膜成纤维细胞的增殖,且呈时间、剂量依赖性,而较低浓度桂皮醛能促进 KOA 炎性滑膜细胞的增殖。因此,可以推断,本实验结果虽然与韩琳研究结果相反,但可能与桂皮醛的浓度有关,桂皮醛低浓度时对内皮细胞有促进增殖、迁移和成管的作用,而高浓度时则有明显的抑制作用。

JAK/STAT 信号通路的发现距现在仅有 30 多年的历史,但应用十分广泛,与细胞增殖、分化等关系密切,在肿瘤、肝脏疾病、造血系统疾病和心脏病中研究较多,在眼科领域的研究较少,近些年发现与糖尿病及并发症具有一定的相关性。郑志^[18]研究发现高血糖引起活性氧生成增加,通过 JAK2/STAT3 信号通路,引起 VEGF 表达上调。VEGF 处于 JAK/STAT 通路的下游,另外也有研究发现 VEGF 可能处于 STAT 通路的上游。Olsson 等^[15]研究结果表明,VEGF 能够快速诱导视网膜微血管内皮细胞 STAT3 磷酸化,从 5 min 开始,15 min 达峰。本文研究发现,15 min, VEGF 即可诱导 EA. hy 926 细胞 JAK2 和 STAT3 快速磷酸化,这与 Bartoli 的报道是一致的。进一步研究发现,桂皮醛(150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能够显著抑制 VEGF 引起的 p-JAK2, STAT3, p-STAT3 蛋白表达升高,桂皮醛(90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能够显著抑制 VEGF 引起的 STAT3, p-STAT3 蛋白表达升高,提示桂皮醛能够抑制 VEGF 引起的 JAK2/STAT3 信号通路激活。

本文的研究结果显示,桂皮醛对 VEGF 诱导 EA. hy 926 细胞的增殖、迁移、成管具有明显的抑制作用,该作用与抑制 JAK2/STAT3 通路的激活有关。但值得注意的是,桂皮醛对新生血管的作用可能与浓度有关,低浓度促进新生血管的形成,而高浓度时抑制,有关桂皮醛对新生血管的抑制作用的机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 冯宇梁,李杰,刘巾男,等. 视网膜脉络膜新生血管性疾病机制及治疗研究进展[J]. 西部医学, 2016, 28(9):1328-1333.
- [2] 宋剑涛,高健生,接传红,等. 密蒙花方干预早期糖尿病视网膜病变初步疗效报告[J]. 中国中医眼科杂志, 2010, 20(5):255-257.
- [3] 严京,高健生,接传红,等. 密蒙花方改善早期糖尿病视网膜病变中医症状及其用药安全性的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(11):773-776.
- [4] 严京,高健生,接传红,等. 密蒙花方对非增殖期糖尿病视网膜眼底病变影响的研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(3):246-248.
- [5] 接传红,高健生,严京,等. 密蒙花方对单纯型糖尿病视网膜病变患者视网膜功能的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2013, 23(3):157-160.
- [6] 接传红,高健生,严京,等. 密蒙花方对单纯型糖尿病视网膜病变患者视网膜功能的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2010, 20(6):323-325.
- [7] CHEN M X, LV H B, GAN J K, et al. Tang wang ming mu granule attenuates diabetic retinopathy in type 2 diabetes rats [J]. Front Physiol, 2017, doi: 10. 3389/fphys. 2017. 01065.
- [8] 张利青,张占刚,付岩,等. 桂皮醛药理作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(23):4568-4572.
- [9] 黄链莎,刘铜华,孙文,等. 桂皮醛对糖尿病小鼠血糖水平的影响及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10):95-100.
- [10] 李秋霞,吴凝,聂闪闪,等. 葛根交泰丸对 2 型糖尿病大鼠的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7):133-138.
- [11] 王刚,张凯伦. 人脐静脉内皮细胞的研究和应用[J]. 医学综述, 2011, 17(4):972-975.
- [12] 宋姗姗,刘明华. 血管内皮生长因子与肿瘤血管生成的研究进展[J]. 四川生理科学杂志, 2010, 32(4):167-169.
- [13] Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection [J]. Bioessays, 2004, 26(9):943-954.
- [14] 游逸安,许雯怡,朱乐如. 增殖性糖尿病视网膜病变玻璃体与血清 SDF-1、VEGF 含量分析[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(1):100-104.
- [15] Olsson A K, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signaling in control of vascular function[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(5):359-371.
- [16] 韩琳. 麝香保心丸中促血管新生活性的药效物质及其作用机制研究[D]. 上海:第二军医大学, 2014.
- [17] 石鑫超,吴忌,王庆甫,等. 桂皮醛对人膝关节滑膜成纤维细胞增殖的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(9):1-3.
- [18] 郑志. 活性氧在糖尿病性视网膜病变中作用机制及干预研究[D]. 上海:上海交通大学, 2007.

[责任编辑 周冰冰]