

本文引用: 龚翠兰, 马强, 杨仁义, 王智槟, 周德生. 基于 JAK2/STAT3 通路探讨活血荣络方对 OGD/R 后 BMEC 的干预作用及机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(3): 350-356.

基于 JAK2/STAT3 通路探讨活血荣络方对 OGD/R 后 BMEC 的干预作用及机制

龚翠兰¹, 马强², 杨仁义³, 王智槟³, 周德生^{2*}

1. 湖南中医药大学附属常德医院, 湖南 常德 415000; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007;

3. 湖南省中西医结合医院, 湖南 长沙 410006

[摘要] **目的** 探讨活血荣络方激活 Janus 酪氨酸激酶 2/信号转导和转录激活剂 3 (Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3) 通路对氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 后脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cell, BMEC) 的干预作用和机制。**方法** 培养大鼠 BMEC (bEnd.3 细胞), 建立 OGD/R 模型; 将细胞随机分为正常组 (10% 空白血清)、模型组 (10% 空白血清)、活血荣络方组 (10% 活血荣络方含药血清)、丁苯酞组 (10% 丁苯酞含药血清)、Stattic 组 (10% 空白血清+10 $\mu\text{mol/mL}$ Stattic)、联用组 (10% 活血荣络方含药血清+10 $\mu\text{mol/mL}$ Stattic), 并分别给予相应的药物干预 24 h。采用 CCK-8 法检测活血荣络方对 OGD/R 后 bEnd.3 细胞活性的影响; 采用划痕实验和 Transwell 迁移实验分别检测活血荣络方对 OGD/R 后 bEnd.3 细胞划痕愈合和细胞迁移的影响; 采用 Western blot 法检测 bEnd.3 细胞中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、血管内皮细胞生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 蛋白表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组 bEnd.3 细胞存活率、细胞划痕愈合率、细胞迁移数显著降低 ($P<0.01$), JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、VEGFA 的表达量升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 活血荣络方组 bEnd.3 细胞的存活率、细胞划痕愈合率、细胞迁移数显著升高 ($P<0.01$), JAK2、p-JAK2、p-STAT3、STAT3、VEGFA 的表达量升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与 Stattic 组比较, 联用组 bEnd.3 细胞的存活率、细胞划痕愈合率、细胞迁移数显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), STAT3、VEGFA 的表达量升高 ($P<0.05$)。**结论** 活血荣络方可能激活 JAK2/STAT3 信号通路并诱导内皮细胞的增殖、迁移和存活, 激活 VEGFA 表达并减轻脑缺血再灌注损伤, 具有神经保护作用。

[关键词] 缺血性脑卒中; 活血荣络方; JAK2/STAT3 通路; 氧糖剥夺/复氧; 脑微血管内皮细胞

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.03.002

Intervention and mechanism of Huoxue Rongluo Formula on BMEC after OGD/R based on JAK2/STAT3 pathway

GONG Cuilan¹, MA Qiang², YANG Renyi³, WANG Zhibing³, ZHOU Desheng^{2*}

1. Changde Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changde, Hunan 415000, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Hunan Provincial Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Changsha, Hunan 410006, China

[Abstract] **Objective** To investigate the intervention and mechanism of Huoxue Rongluo Formula (HXRLF) on brain microvascular endothelial cell (BMEC) after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) by activating Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) pathway. **Methods** Rat BMEC (bEnd.3 cell) was cultivated and an OGD/R model was established. The cells were randomized into normal (10% blank serum), model (10% blank serum), HXRLF (10% HXRLF containing serum), butylph-

[收稿日期] 2023-08-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (8210151338); 湖南省自然科学基金项目 (2022JJ30088, 2023JJ40512, 2021JJ30521, 2021JJ40424); 湖南省卫生健康委员会基金项目 (202203074864)。

[通信作者]* 周德生, 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: zds1101@foxmail.com。

thalide (10% butylphthalide containing serum), Stattic (10% blank serum+10 $\mu\text{mol/mL}$ Stattic), and combination (10% HXRLF serum+10% $\mu\text{mol/mL}$ Stattic) groups, and were given corresponding drug interventions for 24 h, respectively. CCK-8 assay was used to determine the effects of HXRLF on the activity of bEnd.3 cells after OGD/R. Wound healing assay and Transwell migration assay were used to test the effects of HXRLF on scratch healing and cell migration ability of bEnd.3 cells after OGD/R; the protein expression levels of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, and VEGFA in bEnd.3 cells were determined by Western-blot. **Results** Compared with the normal group, the survival rate, scratch healing rate, and cell migration number of bEnd.3 cells in the model group were significantly lower ($P<0.01$), while the expression levels of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, and VEGFA were higher ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the model group, the survival rate, scratch healing rate, and migration number of bEnd.3 cells in the HXRLF group were significantly higher ($P<0.01$), and the expression levels of JAK2, p-JAK2, p-STAT3, STAT3, and VEGFA were significantly higher ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the Stattic group, the survival rate, scratch healing rate, and cell migration number of bEnd.3 cells in the combination group were significantly higher ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the expression levels of STAT3 and VEGFA were higher ($P<0.05$). **Conclusion** HXRLF may activate the JAK2/STAT3 signaling pathway, induce endothelial cell proliferation, migration, and survival, activate VEGFA expression, and alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury, thus exerting neuroprotective effects.

[**Keywords**] ischemic stroke; Huoxue Rongluo Formula; Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 pathway; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; brain microvascular endothelial cell

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)的发病机制尚不完全清楚。神经元的微环境包括脑微血管系统、血管神经网络和神经血管单位,近年来受到了广泛的关注。脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cell, BMEC)是脑微血管系统的重要组成部分,IS导致 BMEC 死亡、血脑屏障破坏而血管通透性增强^[1-3],继发脑水肿的形成和发展,并导致患者预后不良。

脑侧支循环已成为 IS 病因、病机及防治研究领域中的新热点及切入点,对预测 IS 复发有指导意义。Janus 酪氨酸激酶/信号转导和转录激活剂(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)通路是 IS 后 BMEC 增生及血管新生过程中重要的细胞信号转导途径之一,参与细胞的炎症反应、生长应激、生殖、分化、凋亡、坏死和免疫应答等多个环节^[4]。血管内皮生长因子/血管内皮生长因子受体-2/Janus 酪氨酸激酶 2/信号转导和转录激活剂 3(vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor-2/Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3, VEGF/VEGFR-2/JAK2/STAT3)调节血管屏障完整性并抑制 STAT3 依赖性活性,可降低 VEGFA 诱导的血管通透性^[5]。本研究建立氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)模型,观察 OGD/R 处理后的 BMEC 细胞活力、细胞迁移和血管生成的变化,探讨活血荣络方对 BMEC 的保护作用和机制,以期为未来研发保护血管内皮细胞并减轻 IS 后脑缺血再灌注损伤的药物提供新参考。

1 材料

1.1 实验细胞

BMEC bEnd.3 细胞株,购自武汉普诺赛生命科技有限公司(批号:CL-0598)。

1.2 实验动物

从湖南斯莱克景达实验动物有限公司购入 10~12 周龄、体质量为 250~280 g 的雄性 SPF 级 SD 大鼠 15 只,以制备含药血清。大鼠饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心,昼夜交替 12 h,温度 21~26 $^{\circ}\text{C}$,湿度 40%~50%,动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004,合格证号:4307272011011151067,实验经湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(审批号:ZYFY20221111-33)。

1.3 实验药物

活血荣络方组成:鸡血藤 30 g,石楠藤 30 g,生地 15 g,黄精 15 g,玄参 10 g,川芎 10 g,乳香 10 g,没药 10 g。以上药材均购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,经湖南中医药大学第一附属医院张裕民主任药师鉴定为正品。丁苯酞软胶囊(中国石药集团恩必普药业有限公司,批号:1182212145,国药准字:H20050299,规格:0.1 g/粒);Stattic(美国 Selleck 公司,批号:S7024,规格:50 mg)。

1.4 主要试剂

DMEM 无糖培养液、无血清非程序冻存液(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:PM150270, PB180438);胎牛血清、青霉素-链霉素混合液($\times 100$)、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)(美国赛默飞世尔科技有限公司,

批号:13011-8611、15140122、25200056);JAK2 抗体、p-JAK2 抗体、STAT3 抗体、p-STAT3 抗体、VEGFA(艾博抗上海贸易有限公司,批号:ab104687、ab32101、ab68153、ab280202、ab46154); β -actin、山羊抗兔 IgG H&L(巴傲得生物武汉三鹰生物技术有限公司,批号:20536-1-AP、SA00003-2);CCK-8 试剂盒(白鲨生物科技有限公司,批号:CK04);Matrigel 基质胶(美国 Corning 公司,批号:356234);逆转录试剂盒(近岸生物科技有限公司,批号:E047-01B);BCA 蛋白定量试剂盒(联科生物技术股份有限公司,批号:70-PQ0012)。

1.5 主要仪器

普通培养箱、三气培养箱、低温高速离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司,型号:3427、3131、Fresco17);温水浴锅(美国 Crystal 仪器公司,型号:SYG-1210);倒置显微镜(德国 ZEISS 公司,型号:Axio Vert.A1);多功能酶标仪(美国 BioTek 公司,型号:Cytation3);超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司,型号:SW-CJ-1F);Mini-Protean Tetra 电泳槽、Mini Trans-Blot 转印槽、Gel Doc XR+凝胶成像系统、PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:153BR90552、VE-186、712BR12725、621BR25450);Transwell 小室(苏州赛宁生物技术有限公司,型号:1101130-T)。

2 方法

2.1 BMEC 的培养

细胞复苏:将 BMEC bEnd.3 细胞放置于预热至 37 °C 的水浴锅中解冻,转移至 15 mL 离心管后加入 3 mL DMEM 完全培养基,于离心机中配平后以 1 000 r/min 离心 5 min(离心半径 10 cm)。去除上清液后,加入 4 mL DMEM 完全培养基,均匀充分混悬后,转移至 25T 细胞培养瓶,于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养,次日换液,观察细胞形态。细胞培养:在 DMEM 培养基(含 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素)中培养 bEnd.3 细胞,于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养。细胞传代:待 bEnd.3 细胞密度达到 70%~80% 时进行传代,PBS 洗涤 3 次后用 0.25% 胰酶消化 2 min,观察到 bEnd.3 细胞间隙变大或脱落时,用完全培养基停止消化,1 000 r/min 低温离心 5 min(离心半径 10 cm),以 1:3 比例转移至新的细胞培养瓶进行传代,于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中继续培养。

2.2 OGD/R 模型的建立

参照颜思阳^[6]构建的大鼠 BMEC 的 OGD/R 细胞模型方法,制备 bEnd.3 细胞 OGD/R 模型,取对数期 bEnd.3 细胞构建模型,PBS 洗涤 3 次后,加入无糖 DMEM 培养基,将 bEnd.3 细胞置于三气培养箱(5% CO₂、95% N₂、1% O₂,37 °C)中培养 2 h,氧糖剥夺 2 h 后更换完全培养基,于普通培养箱(5% CO₂、37 °C)中培养 24 h,建立 bEnd.3 细胞 OGD/R 模型。

2.3 含药血清的制备

15 只 SD 大鼠按照随机数字表法随机分为 3 组:空白血清组($n=5$)、活血荣络方含药血清组($n=5$)、丁苯酞含药血清组($n=5$)。活血荣络方含药血清组以活血荣络方浸膏稀释液[生药 23.4 g/(kg·d)]灌胃;丁苯酞含药血清组以 8 g/L 丁苯酞混悬液(0.1 g 丁苯酞软胶囊溶于 12.5 mL Tween80 溶液)灌胃;空白血清组给予等体积蒸馏水灌胃。每日于早晚 8 点进行灌胃,连续 7 d。于末次灌胃 1 h 后以 10% 水合氯醛(3 mg/kg)深度麻醉大鼠,暴露腹主动脉。使用负压采血管采集全血 5 mL 至无抗凝剂的普通采血管中,静置 1 h,3 000 r/min 离心 10 min(离心半径 10 cm),收集上清液于离心管中,于 56 °C 水浴灭活 30 min,再经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌,后分装于 2 mL EP 管中,统一置于 -80 °C 冰箱保存备用。

2.4 细胞分组及给药

细胞分为正常组、模型组、活血荣络方组、丁苯酞组、Stattic 组、活血荣络方+Stattic 组(简称联用组)。参照课题组前期给药剂量及方法^[7],于复糖复氧的同时,正常组、模型组加入 10% 空白血清,活血荣络方组和丁苯酞组各自加入 10% 含药血清,Stattic 组加入 10% 空白血清+10 μ mol/mL Stattic(预处理 3 h),联用组则加入 10% 活血荣络方血清+10 μ mol/mL Stattic(预处理 3 h),各组均干预 24 h。

2.5 细胞增殖检测

采用 CCK-8 法检测活血荣络方对 OGD/R 后 bEnd.3 细胞活性的影响。将 bEnd.3 细胞以 1×10^5 接种于 96 孔板(100 μ L/孔),每个组设置 3 个复孔,待细胞贴壁。于 OGD/R 后,加入含有相应体积的空白血清/含药血清的培养基干预 24 h。按照 CCK-8 试剂盒说明书进行操作,每孔加入 10 μ L 溶液,于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中孵育 40 min,采用酶标仪测定 450 nm 波长处的 OD 值,实验重复 3 次。细胞存活率=[(治疗组-正常组)/(模型组-正常组)] \times 100%。

2.6 细胞划痕实验

采用划痕实验研究活血荣络方对 OGD/R 后 bEnd.3 细胞划痕愈合的影响。孔板标记:用记号笔

在6孔板背面等距离均匀绘制5条横线,每条间隔0.5 cm,横穿过孔。细胞铺板:将bEnd.3细胞以 1×10^5 接种于6孔板,每孔 1×10^5 个细胞。细胞划线:孵育24 h待细胞贴壁后,用10 μ L枪头以垂直于标记的横线作划痕,划痕后PBS洗3次,使划线清晰可见。在每组孔内加入含有相应体积的空白血清/含药血清的培养基,将细胞于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱中孵育24 h,用倒置显微镜进行拍照,随机选取6条划线,实验重复3次。采用Image J软件计算,细胞间划痕宽度=划痕空隙面积/高度;细胞划痕愈合率=(干预后划痕面积/干预前划痕面积) $\times 100\%$ 。

2.7 Transwell 细胞迁移愈合实验

采用Transwell迁移实验研究活血荣络方对OGD/R后bEnd.3细胞迁移的影响。细胞悬液制备:将处理后的bEnd.3细胞用胰酶消化后,用无血清的培养基重悬,制备细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL。细胞接种:下室加入600 μ L含15% FBS的培养基,上室加入200 μ L细胞悬液,于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱中培养24 h。固定染色:取出Transwell小室,PBS洗3次,用棉签擦掉上室中未迁移的细胞及残余液体,恒温箱中甲醇固定30 min,风干Transwell小室。Transwell小室在0.1%结晶紫中染色30 min,PBS洗涤3次,用棉签将液体擦拭干净。采用倒置显微镜,随机选取5个视野观察细胞并计数。

2.8 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、VEGFA 蛋白表达水平检测

采用Western blot法检测bEnd.3细胞中JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、VEGFA蛋白表达水平。细胞分组及处理:取对数生长期bEnd.3细胞,以 1×10^5 接种于96孔板(100 μ L/孔),每个组设置3个复孔,待细胞贴壁。于OGD/R后,加入含有相应体积的空白血清/含药血清的培养基干预24 h。蛋白提取:bEnd.3细胞复氧复糖24 h后,PBS洗涤3次后再加入1 mL PBS缓冲液,刮取细胞并吹打均匀后转移至EP管。于4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min条件下,离心5 min(离心半径10 cm),去除细胞上清液后加入200 μ L裂解液。于冰上裂解30 min后,12 000 r/min、低温离心10 min(离心半径10 cm),将上清液转移至新的EP管。采用BCA法测定总蛋白浓度,蛋白上样量为3 μ g/ μ L,10 μ L/孔。经SDS-PAGE凝胶电泳、转膜。JAK2、STAT3用5%脱脂牛奶室温封闭1.5 h,p-JAK2、p-STAT3用5%BSA封闭1.5 h。一抗JAK2(1:2 000)、p-JAK2(1:2 000)、STAT3(1:2 000)、p-STAT3(1:2 000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,洗膜3次,10 min/次。

二抗(1:10 000)37 $^{\circ}$ C恒温水浴摇床孵育60 min,再次洗膜后显色成像。使用Image J分析图像灰度值,以目的蛋白与 β -actin灰度值的比值表示蛋白相对表达量。

2.9 统计学处理

采用SPSS 23.0软件进行统计学分析,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。组间比较若符合正态性与方差齐性,采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法;方差不齐时,采用Dunnett's T3法;若不符合正态性,采用Kruskal-Wallis秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 活血荣络方含药血清对 OGD/R 后 bEnd.3 细胞增殖的影响

与正常组比较,模型组bEnd.3细胞存活率显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,活血荣络方组、联用组、丁苯酞组细胞存活率显著升高($P < 0.01$);与Stattic组比较,活血荣络方组、联用组及丁苯酞组细胞存活率显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表1。

表1 各组bEnd.3细胞存活率比较($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

分组	细胞存活率
正常组	100.00 \pm 7.57
模型组	60.00 \pm 5.50**
活血荣络方组	79.93 \pm 4.60* ^{##} $\Delta\Delta$
Stattic组	66.50 \pm 0.76**
联用组	76.64 \pm 1.26* ^{##} Δ
丁苯酞组	83.15 \pm 5.23* ^{##} $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.01$;与Stattic组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。

3.2 活血荣络方含药血清对 OGD/R 后 bEnd.3 细胞划痕愈合率的影响

与正常组比较,模型组愈合率显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,活血荣络方组、丁苯酞组、联用组细胞愈合率显著升高($P < 0.01$);与活血荣络方组及丁苯酞组比较,Stattic组及联用组细胞愈合率显著降低($P < 0.01$);与Stattic组比较,联用组细胞愈合率升高($P < 0.05$)。详见图1、表2。

3.3 活血荣络方含药血清对 OGD/R 后 bEnd.3 细胞 Transwell 迁移的影响

与正常组比较,模型组迁移细胞个数显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,活血荣络方组、丁苯酞组、联用组迁移细胞个数显著升高($P < 0.01$);与丁苯酞组比较,Stattic组及联用组迁移细胞个数显著降低

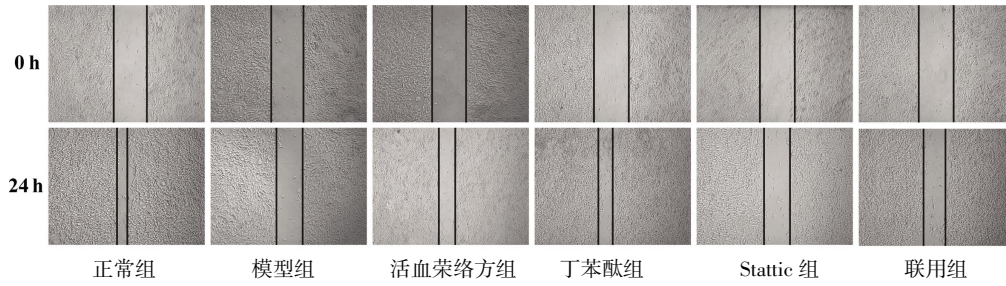


图 1 各组 bEnd.3 细胞划痕愈合图 (n=5, ×100, 倒置显微镜)

表 2 各组 bEnd.3 细胞划痕愈合率比较 (n=5, $\bar{x} \pm s, \%$)

分组	划痕愈合率
正常组	65.15±3.38
模型组	25.29±5.71**
活血荣络方组	56.61±7.82 [#]
丁苯酞组	58.47±3.55 [#]
Stattic 组	23.50±2.44**●●▲▲
联用组	37.13±2.01 [#] ●●▲▲△

注:与正常组比较,**P<0.01;与模型组比较,[#]P<0.01;与活血荣络方组比较,●●P<0.01;与丁苯酞组比较,▲▲P<0.01;与 Stattic 组比较,△P<0.05。

表 3 各组 bEnd.3 细胞迁移个数比较 (n=5, $\bar{x} \pm s, \text{个}$)

分组	细胞迁移数
正常组	224.00±11.27
模型组	73.33±17.04**
活血荣络方组	164.33±7.09 [#] △△
丁苯酞组	169.00±16.82 [#]
Stattic 组	55.00±3.61**○○
联用组	104.33±7.09 [#] ○○△△

注:与正常组比较,**P<0.01;与模型组比较,[#]P<0.01;与丁苯酞组比较,○○P<0.01;与 Stattic 组比较,△△P<0.01。

(P<0.01);与 Stattic 组比较,活血荣络方组及联用组迁移细胞个数显著升高(P<0.01)。详见表 3、图 2。

3.4 活血荣络方含药血清对 OGD/R 后 bEnd.3 细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、VEGFA 蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、VEGFA 蛋白表达升高(P<0.05 或 P<0.01);与模型组比较,活血荣络方组与丁苯酞组 JAK2、p-JAK2、p-STAT3、STAT3、VEGFA 蛋白表达升高(P<0.05

或 P<0.01),Stattic 组 p-JAK2、STAT3、p-STAT3、VEGFA 蛋白表达降低(P<0.05 或 P<0.01);与丁苯酞组比较,Stattic 组 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、VEGFA 蛋白表达降低(P<0.05 或 P<0.01),联用组 STAT3、p-STAT3、VEGFA 蛋白表达降低(P<0.05 或 P<0.01);与 Stattic 组比较,活血荣络方组及联用组 STAT3、VEGFA 蛋白表达升高(P<0.05 或 P<0.01),活血荣络方组 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达升高(P<0.05 或 P<0.01)。详见表 4、图 3。

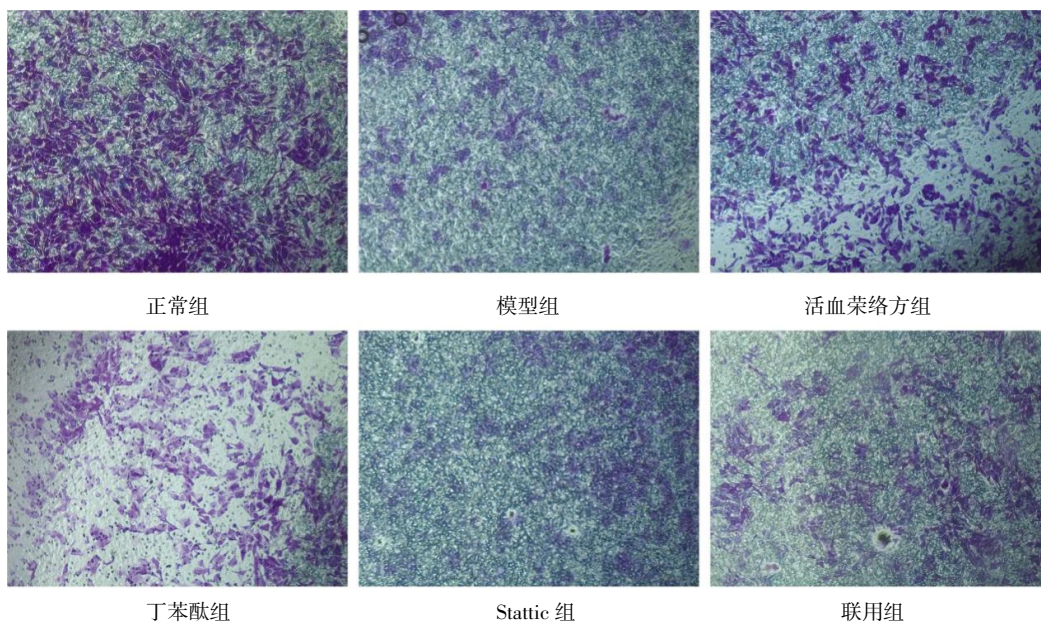


图 2 各组 bEnd.3 细胞 Transwell 迁移染色图 (n=5, ×200)

表4 各组细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、VEGFA 蛋白表达比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组	JAK2/ β -actin	p-JAK2/JAK2	STAT3/ β -actin	p-STAT3/STAT3	VEGFA/ β -actin
正常组	1.10 \pm 0.08	0.36 \pm 0.14	0.65 \pm 0.30	0.87 \pm 0.15	1.03 \pm 0.14
模型组	1.25 \pm 0.01*	0.99 \pm 0.11**	1.28 \pm 0.34*	2.11 \pm 0.06**	2.18 \pm 0.21**
活血荣络方组	1.51 \pm 0.04 [#] Δ	1.49 \pm 0.20 [#] $\Delta\Delta$	3.18 \pm 0.23 [#] $\Delta\Delta$	3.39 \pm 0.13 [#] $\Delta\Delta$	3.47 \pm 0.21 [#] $\Delta\Delta$
丁苯酞组	1.54 \pm 0.11 [#]	1.50 \pm 0.28 [#]	3.31 \pm 0.41 [#]	3.31 \pm 0.24 [#]	3.52 \pm 0.14 [#]
Sttatic 组	1.35 \pm 0.04 ^o	0.81 \pm 0.16 ^o Δ	0.64 \pm 0.22 ^o Δ	0.78 \pm 0.27 ^o Δ	1.26 \pm 0.17 ^o Δ
联用组	1.48 \pm 0.11	1.08 \pm 0.12	0.89 \pm 0.38 ^o Δ	0.98 \pm 0.21 ^o Δ	1.60 \pm 0.09 ^o Δ

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与丁苯酞组比较,^o $P<0.05$,^o $P<0.01$;与 Sttatic 组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

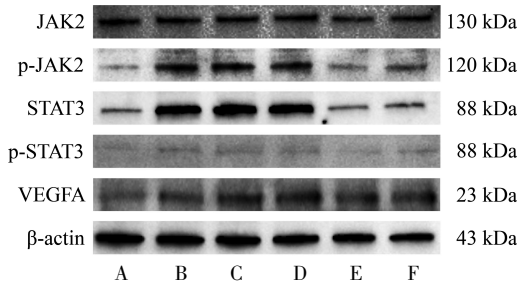


图3 各组细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、VEGFA 蛋白条带图

注:A.正常组;B.模型组;C.活血荣络方组;D.丁苯酞组;E.Sttatic 组;F.联用组。

4 讨论

IS 急性期的关键治疗措施是尽快改善侧支循环及缺氧、避免脑缺血再灌注损伤,抑制炎症发生可能是治疗 IS 的新策略^[8]。BMEC 是脑微血管的基本结构及脑血管新生的关键细胞和直接靶点,本实验通过制备 OGD/R 模型,在低氧、低糖等条件下培养 BMEC(bEnd.3 细胞),在体外成功模拟在体动物的缺血缺氧状态和再灌注损伤。结果表明,与模型组及 Sttatic 组比较,活血荣络方组 bEnd.3 细胞存活率、划痕愈合率、细胞迁移数均显著增加,提示该方可能通过抑制炎症反应而减轻缺血缺氧后的 BMEC 损伤。

Sttatic 是第一种非肽类靶向小分子抑制剂,其分子量小、脂溶性好,可较好地透过血脑屏障,能抑制 STAT3 的激活、二聚化和核易位,能精准靶向抑制 STAT3 通路^[9]。本研究设置 Sttatic 组和联用组作对照,故更客观而精准。结果表明,与 Sttatic 组比较,活血荣络方含药血清能明显上调 VEGFA、p-JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白表达量,提示该方与 Sttatic 的作用相反,具有激活 JAK2/STAT3 通路的作用;而联用组中加入 Sttatic,成功模拟脑缺血再灌注损伤后炎症反应对 BMEC 增生的抑制作用,活血荣络方仍能上调 JAK2/STAT3 通路相关蛋白的表达,证实该方可能通过激活 JAK2/STAT3 通路而有效减轻 IS

后血管内皮细胞的损伤,从而发挥改善脑侧支循环的作用。

丁苯酞不仅可抑制炎症因子、控制神经元焦亡、减轻缺血再灌注损伤,还可增加软脑膜血管管径、提高 VEGF 的浓度、促进侧支循环的建立并提高脑血流量^[10]。Western blot 检测结果显示:与模型组比较,活血荣络方组与丁苯酞组 JAK2、p-JAK2、p-STAT3、STAT3、VEGFA 蛋白表达均升高;且活血荣络方血清与丁苯酞血清干预效果相当,提示活血荣络方可能通过介导靶基因 JAK2、p-JAK2、p-STAT3、STAT3、VEGFA,激活 JAK2-STAT3 信号通路而动态调控血管内皮细胞增殖、迁移和管腔形成,促进脑血管新生,发挥修复神经功能的作用。

JAK2-STAT3 信号通路是参与细胞增殖、迁移、代谢、凋亡和血管新生的重要信号转导途径。Sttatic 能阻止 Tyr705 位点 STAT3 磷酸化而抑制 STAT3 二聚体激活和核易位^[11]。本研究结果表明,对比模型组,活血荣络方组的细胞存活率和细胞迁移数显著增高,而 Sttatic 组的增殖和迁移率显著降低,联用组在 Sttatic 作用下仍能发挥部分作用,证明活血荣络方含药血清能更好地促进 OGD/R 后 BMEC 的增殖和迁移,而且可能通过促进 JAK2/STAT3 信号通路激活 VEGFA 表达,而达到促 OGD/R 后 BMEC 细胞增生并保护神经元的作用。

VEGF 是血管新生的分子枢纽,当与其内皮细胞中的膜蛋白受体 VEGFR2 结合时可促进细胞增殖、迁移和血管形成^[12-13]。BMEC 损伤时,VEGF 通路被激活,VEGF 可通过诱导 BMEC 的抗凋亡蛋白表达维持新生血管中内皮细胞的生存而促进血管新生^[14]。单独上调 VEGF 表达所诱导的血管新生发育不完整,血管壁具有一定渗透性,但如果同时增加 JAK、STAT3 的表达,则能同时抑制新生血管渗漏并促进成熟血管形成^[15]。Western blot 结果显示,与模型组、Sttatic 组比较,活血荣络方含药血清能上调 VEGFA、JAK2、p-JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白表达。证实该

方能激活JAK2/STAT3信号通路、诱导细胞的增殖、迁移和存活,增加血管的通透性并保护神经元;同时,激活VEGFA表达而促进血管新生。

活血荣络方具有养阴生津、活血通脉的功效,对缺血性中风阴虚血瘀证疗效显著^[16-17]。鸡血藤中含有黄酮类、酚酸类、苯丙素类等,具有抗氧化、抗炎、抗病毒、保护心脑血管等作用^[18]。石南藤中含有丰富的血小板活化因子受体拮抗剂——南藤素和海风藤酮,具有清除氧自由基、抗氧化的能力^[19]。川芎作用于突触结构、突触功能等,对神经元起保护作用,阿魏酸针叶酯和阿魏酸是川芎提取物中防治IS的关键物质^[20]。生地黄提取物具有抗氧化、抗衰老、抗炎和保护神经的特性,其活性成分梓醇可减轻神经元凋亡和能量代谢衰竭^[21]。乳香具有抗氧化、抗炎、抗淀粉样蛋白形成和抗凋亡特性^[22]。

综上所述,活血荣络方能激活JAK2/STAT3信号通路并诱导内皮细胞的增殖、迁移和存活,能上调VEGFA表达并减轻脑缺血再灌注损伤,具有神经保护作用,为进一步研究该方打下基础。

参考文献

- [1] TORRES-LÓPEZ C, CUARTERO M I, GARCÍA-CULEBRAS A, et al. Ipsilesional hippocampal GABA is elevated and correlates with cognitive impairment and maladaptive neurogenesis after cortical stroke in mice[J]. *Stroke*, 2023, 54(10): 2652-2665.
- [2] GUO J, WANG H L, JIANG X, et al. An untargeted lipidomics study of acute ischemic stroke with hyperglycemia based on ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2022, 2022: 8332278.
- [3] ZHANG M Q, TANG M M, WU Q, et al. LncRNA DANCR attenuates brain microvascular endothelial cell damage induced by oxygen-glucose deprivation through regulating of miR-33a-5p/XBP1s[J]. *Aging*, 2020, 12(2): 1778-1791.
- [4] WANG L, ASTONE M, ALAM S K, et al. Suppressing STAT3 activity protects the endothelial barrier from VEGF-mediated vascular permeability[J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2021, 14(11): 1-14.
- [5] WANG Y, SU X W, LEUNG G H D, et al. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for ischemic stroke: Evidence from comprehensive analysis and real-world validation[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2023, 20(8): 1009-1023.
- [6] 颜思阳. 基于PINK1/Parkin信号通路探讨活血荣络方对脑缺血再灌注损伤保护的作用机制[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- [7] 杨仁义. 基于荣气理论探讨活血荣络方调控“TF-miRNA”反馈环促脑梗死后血管新生的机制研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- [8] XIANG W, WEI H C, LIANG Z G, et al. FLAIR vascular hyperintensity combined with asymmetrical prominent veins in acute anterior circulation ischemic stroke: Prediction of collateral circulation and clinical outcome[J]. *European Journal of Medical Research*, 2023, 28(1): 446.
- [9] 任泉, 李佳博, 王旭亚, 等. JSH-23联合Stattic靶向NF- κ B和STAT3双信号转导通路抑制胶质瘤细胞增殖和迁移实验研究[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2022, 22(5): 393-403.
- [10] 郑勇, 程贝, 陈亦辉, 等. 星萎承气汤联合丁苯酞治疗缺血性脑卒中疗效及对患者氧化应激、血液流变学的影响[J]. *陕西中医*, 2023, 44(2): 191-194.
- [11] KABIRI M, HEMMATPOUR A, ZARE F, et al. Paroxetine modulates immune responses by activating a JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2020, 34(5): e22464.
- [12] GHOSH A, DASGUPTA D, GHOSH A, et al. MiRNA199a-3p suppresses tumor growth, migration, invasion and angiogenesis in hepatocellular carcinoma by targeting VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, HGF and MMP2[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(3): e2706.
- [13] 张振强, 贾亚泉, 王自闯, 等. 化痰通络汤预先灌胃的合并高脂血症脑缺血大鼠神经系统功能、脑组织病理变化观察[J]. *山东医药*, 2018, 58(43): 47-50.
- [14] 尹倩, 周德生, 陈瑶, 等. 基于NLRP3炎症小体探讨活血荣络方对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响及机制[J]. *中国中医药信息杂志*, 2023, 30(9): 115-121.
- [15] WANG G R, CHEN Z Y, SONG Y Y, et al. Xueshuantong injection alleviates cerebral microcirculation disorder in middle cerebral artery occlusion/reperfusion rats by suppressing inflammation via JNK mediated JAK2/STAT3 and NF- κ B signaling pathways[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 298: 115592.
- [16] 谢清, 周德生, 刘雨濛. 探讨缺血性中风阴虚血瘀与荣气虚滞的相关性[J]. *中医临床研究*, 2021, 13(9): 28-30.
- [17] 龚翠兰, 杨仁义, 周德生, 等. 基于miR-370-3p与JAK2/STAT3通路相关性探讨活血荣络方促缺血性脑卒中后血管新生的机制[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(2): 297-304.
- [18] 关媛, 王雪盈, 孙媛媛, 等. 鸡血藤提取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(7): 126-132.
- [19] 覃亮, 刘航博, 韦宇, 等. 石楠藤多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. *生物化工*, 2022, 8(1): 35-37, 43.
- [20] ZENG P, YI Y, SU H F, et al. Key phytochemicals and biological functions of Chuanxiong rhizoma against ischemic stroke: A network pharmacology and experimental assessment[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 758049.
- [21] YUAN H X, YANG M, HAN X M, et al. The therapeutic effect of the Chinese herbal medicine, rehmanniae Radix preparata, in attention deficit hyperactivity disorder via reversal of structural abnormalities in the cortex[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 2018: 3052058.
- [22] RAJABIAN A, SADEGHNIA H, FANOUDI S, et al. Genus *Boswellia* as a new candidate for neurodegenerative disorders[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2020, 23(3): 277-286.