

# 虎杖苷通过调节 JAK2/STAT3 信号通路改善 血管内皮细胞损伤的研究

孔稳稳<sup>1,2</sup>, 韦惠珍<sup>3</sup>, 徐媛颖<sup>3</sup>, 沙雯君<sup>3</sup>, 鲁郡<sup>3</sup>, 雷涛<sup>1,2,3</sup>

**摘要** 目的 探讨虎杖苷通过蛋白酪氨酸激酶 2 (JAK2) / 信号传导与转录激活因子 3 (STAT3) 信号通路对脂多糖 (LPS) 诱导的人脐静脉血管内皮细胞 (HUVECs) 损伤的保护作用。方法 体外培养 HUVECs 500 ng/ml LPS 诱导其损伤, 设为模型组; 在模型组基础上, 用不同浓度 (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 虎杖苷干预 HUVECs 24 h, 分别设置为虎杖苷低浓度组、虎杖苷中浓度组和虎杖苷高浓度组; 另设对照组。CCK-8、单核细胞-内皮细胞黏附、划痕和 Transwell 实验检测细胞活力、黏附、迁移和侵袭能力; ELISA 法检测细胞上清液中白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 含量; Western blot 法检测 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达水平。结果 与对照组比较, 模型组细胞存活率下降 ( $P < 0.01$ ), 细胞黏附、迁移及侵袭能力增强 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 细胞上清液中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量增加 ( $P < 0.001$ ), 细胞中 JAK2 和 STAT3 蛋白磷酸化水平升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 虎杖苷干预后, LPS 损伤细胞情况减轻, 虎杖苷低、中、高浓度组细胞存活率增加 ( $P < 0.05$ ), 细胞黏附、迁移和侵袭能力下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ), 细胞上清液中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量下降 ( $P < 0.05$ ), 细胞中 JAK2 和 STAT3 蛋白磷酸化水平降低 ( $P < 0.05$ )。结论 虎杖苷能有效减轻 LPS 对 HUVECs 的炎症损伤, 减少炎症因子分泌, 抑制内皮细胞黏附、迁移和侵袭, 其机制可能与虎杖苷下调 JAK2/STAT3 信号通路相关。

**关键词** 动脉粥样硬化; 人脐静脉内皮细胞; 虎杖苷; JAK2/STAT3 信号通路

中图分类号 R 543.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1201-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.014

血管内皮细胞对于维持心血管系统稳态具有十分重要的意义。在高血糖、高血脂及感染等致病因素的刺激下, 内皮细胞极易诱发炎症反应, 进而引起内皮细胞损伤及功能障碍, 导致血管疾病的发生及发展, 如动脉粥样硬化、糖尿病血管病变等<sup>[1]</sup>。蛋白酪氨酸激酶 2 (janus kinase 2, JAK2) / 信号转导和转录激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 信号通路在调节细胞炎症中起着重要作用<sup>[2]</sup>。STAT3 是调节白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等炎症因子的重要启动因子, 通过抑制 STAT3 磷酸化降低炎症因子的表达, 改善内皮功能障碍<sup>[3]</sup>。虎杖苷是从虎杖根茎中提取的天然活性成分, 具有抗氧化、抗炎和降血糖等作用<sup>[4]</sup>。该研究通过构建脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 损伤模型, 给予不同浓度虎杖苷处理, 旨在研究虎杖苷对血管内皮细胞损伤的潜在治疗作用及其可能的分子机制, 为动脉粥样硬化的防治提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞** HUVECs、人单核细胞白血病细胞系 THP-1 均购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

**1.1.2 药物与试剂** 虎杖苷 (上海融禾医药有限公司) 纯度:  $\geq 98\%$ , 批号 220813; LPS (美国 Sigma 公司); CCK-8 试剂盒 (日本同仁化学研究所); IL-6 和 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); Anti-STAT3 抗体、Anti-p-STAT3 抗体、Anti-JAK2 抗体和 Anti-p-JAK2 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); Anti-GAPDH 抗体 (英国 Abcam 公司)。

**1.1.3 仪器** CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (美国 Thermo 公

2024-04-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81774083); 上海市普陀区卫生健康系统临床特色专科建设项目 (编号: 2020tszk01); 上海市医学重点专科建设项目 (编号: ZK2019B16); 上海市普陀区卫生健康系统科技创新项目 (编号: ptkwsw202003); 上海市卫生健康委员会课题 (编号: 202240309)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学上海普陀中心临床学院, 上海 200062

<sup>2</sup> 安徽医科大学第五临床医学院, 合肥 230032

<sup>3</sup> 上海中医药大学附属普陀医院内分泌科, 上海 200062

作者简介: 孔稳稳, 女, 硕士研究生;

雷涛, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: leitao5899@126.com

司);垂直电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);免疫倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司);细胞超声破碎机(美国 SONICS 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** HUVECs 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育,每 1~2 d 换液,待细胞融合度达 90% 后,在无菌细胞操作台条件下用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,传代接种于新的培养皿中,取 3~6 代用于实验。

**1.2.2 CCK-8 试剂盒检测 HUVECs 存活率** 取 3~6 代的 HUVECs 按照每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板,加入不同浓度虎杖苷(0、10、20、30、40 和 50  $\mu\text{mol/L}$ ) 孵育 24 h 后,加入 10% CCK-8 溶液,孵育 2 h,在 450 nm 处测光密度(optical density, OD)。细胞存活率 = (药物组 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白孔 OD 值)  $\times 100\%$ 。

**1.2.3 建立模型** 取 3~6 代 HUVECs 按照每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板中,加入不同浓度的 LPS (0、100、300、500、700 和 900 ng/ml) 孵育 24 h 后,用 CCK-8 法测定各孔的 OD 值,计算细胞存活率。

**1.2.4 实验分组** 根据“1.2.2”和“1.2.3”实验结果,分为 5 组:对照组、模型组(500 ng/ml LPS)、虎杖苷低浓度组(10  $\mu\text{mol/L}$  虎杖苷预处理 2 h 后加入 500 ng/ml LPS)、虎杖苷中浓度组(20  $\mu\text{mol/L}$  虎杖苷预处理 2 h 后加入 500 ng/ml LPS)、虎杖苷高浓度组(40  $\mu\text{mol/L}$  虎杖苷预处理 2 h 后加入 500 ng/ml LPS)。

**1.2.5 实验给药时间** 取 3~6 代 HUVECs 按照每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板中,次日按照实验分组加入药物,使用 CCK-8 试剂盒分别在 12、24 和 48 h 测定各组的 OD 值,计算细胞存活率。

**1.2.6 细胞黏附测定** 将 HUVECs 接种到 6 孔板中并培养到融合度约 90%,在用 500 ng/ml LPS 刺激前,用 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  虎杖苷处理细胞 2 h。在 HUVECs 细胞处理结束前 40 min 左右,在 RPMI-1640 培养基中用荧光 pH 指示剂 BCECF-AM 标记 THP-1 细胞 30 min 将 THP-1 细胞按照每孔  $5 \times 10^5$  个细胞接种到 6 孔板 HUVECs 细胞中,继续孵育 45 min。孵育结束后,用 PBS 润洗 2 遍,置于免疫倒置荧光显微镜下观察 THP-1 细胞形态并拍照,使用 ImageJ 软件对 THP-1 细胞进行定量分析。

**1.2.7 细胞划痕实验检测细胞迁移** 将 HUVECs 细胞铺于 6 孔板中,待细胞长至均匀铺满皿底时,用枪头沿 6 孔板纵轴进行划线,用 PBS 洗去未贴壁细

胞,在倒置显微镜下随机拍摄 3 个视野,此时记录为 0 h。然后向各孔中加入含相应药物的低血清培养基,继续培养 24 h 后在倒置显微镜下观察划痕 0 h 同一位置细胞迁移情况并拍照,计算划痕区域面积求得愈合率,实验重复 3 次。

**1.2.8 Transwell 实验检测细胞侵袭** 将小室置于 24 孔板中,下室加入 750  $\mu\text{l}$  5% ECM 培养基,上室加入 200  $\mu\text{l}$  含药的无血清 ECM 培养基的细胞悬液,细胞分组及给药同“1.2.4”项,孵育 24 h。4% 多聚甲醛固定 15 min,0.1% 结晶紫染液染色 15 min 静置晾干,最后用棉球轻轻擦拭小室,在倒置显微镜观察并拍照,并用 ImageJ 软件计数。

**1.2.9 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-6、TNF- $\alpha$  的含量** 取对数生长期的 HUVECs 细胞铺于 6 孔板中,细胞分组及给药同“1.2.4”项,继续孵育 24 h 后,收集细胞上清液。根据 ELISA 试剂盒说明书步骤测定 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量。

**1.2.10 Western blot 检测 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达水平** 将 HUVECs 按照“1.2.4”的方法进行分组和给药,放入培养箱孵育 24 h。吸弃上清液后,PBS 洗涤,每孔加入 80  $\mu\text{l}$  裂解液,置于冰上充分裂解,14 000 r/min 离心 15 min;取上清液至预冷离心管中。采用 BCA 法测定蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液,100 °C 煮 5 min。取各组蛋白样品 20  $\mu\text{l}$  进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,随后将蛋白电转至 PVDF 膜上,放于 5% BSA 封闭液中,室温摇床封闭 1.5 h。添加一抗(JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、GAPDH,1:1 000) 4 °C 摇床过夜,清洗 3 次,加入二抗孵育 1 h,再次洗膜 3 次,用 ECL 化学发光液显影。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析,每个实验重复进行 3 次,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,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 虎杖苷对 HUVECs 存活率的影响** 与对照组比较,细胞存活率随着虎杖苷浓度的升高而增加( $P < 0.05$ ),因此选择 10、20 和 40  $\mu\text{mol/L}$  浓度用于后续实验。见表 1。

**2.2 LPS 诱导 HUVECs 损伤的浓度筛选** 与对照组比较,LPS 以剂量依赖性抑制 HUVECs 的活力( $P < 0.001$ ),其中 100、300 ng/ml LPS 对 HUVECs 有轻度毒性,而 700、900 ng/ml LPS 对 HUVECs 具有

高度毒性,因此选择 500 ng/ml LPS 进行后续实验。见表 2。

表 1 不同浓度虎杖苷对 HUVECs 存活率的影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	浓度( $\mu\text{mol/L}$ )	细胞存活率(%)
对照		100.00
虎杖苷	10	103.07 $\pm$ 0.48*
	20	107.17 $\pm$ 1.38***
	30	110.31 $\pm$ 1.38***
	40	114.16 $\pm$ 1.69***
	50	117.77 $\pm$ 1.15***
F 值		98.31
P 值		<0.001

与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$

表 2 不同浓度 LPS 对 HUVECs 活力的影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	浓度(ng/ml)	细胞存活率(%)
对照		100.00
LPS	100	93.22 $\pm$ 1.06***
	300	87.22 $\pm$ 1.56***
	500	81.25 $\pm$ 1.41***
	700	75.53 $\pm$ 0.41***
	900	69.74 $\pm$ 2.25***
F 值		210.45
P 值		<0.001

与对照组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

**2.3 虎杖苷对 LPS 损伤的 HUVECs 存活率的影响** 与对照组比较,模型组细胞存活率明显下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,虎杖苷低、中、高浓度组细胞存活率增加( $P < 0.05$ )。随着药物作用时间增加,各组细胞存活率逐渐下降,在 24 h 时,细胞存活率下降最为明显。因此选择药物作用 24 h 进行后续实验。见表 3。

**2.4 虎杖苷对 THP-1 黏附 HUVECs 的影响** 与对照组比较,模型组黏附的细胞数明显增加 [(184.67  $\pm$  7.23) 个 vs (15.67  $\pm$  3.21) 个,  $P < 0.001$ ];与模型组比较,虎杖苷低、中、高浓度组黏附的细胞数量明显减少 [(133.00  $\pm$  4.58)、(105.00  $\pm$  2.00)、(81.00  $\pm$  11.27) 个 vs (184.67  $\pm$  7.23) 个,  $P < 0.05$ ]。见图 1。

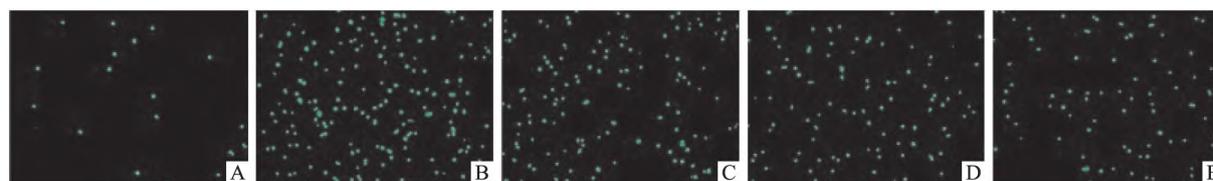


图 1 虎杖苷对 HUVECs 与 THP-1 黏附能力的影响  $\times 100$

A: 对照组; B: 模型组; C: 虎杖苷低浓度组; D: 虎杖苷中浓度组; E: 虎杖苷高浓度组

表 3 不同时间条件下虎杖苷对 LPS 损伤 HUVECs 存活率的影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	12 h 细胞存活率(%)	24 h 细胞存活率(%)	48 h 细胞存活率(%)
对照	100.00	100.00	100.00
模型	85.16 $\pm$ 0.66**	80.98 $\pm$ 0.69***	79.46 $\pm$ 0.69***
虎杖苷低浓度	87.35 $\pm$ 0.37#	84.19 $\pm$ 0.47##	82.42 $\pm$ 0.10#
虎杖苷中浓度	91.11 $\pm$ 0.09##	87.64 $\pm$ 0.50#	86.05 $\pm$ 0.67##
虎杖苷高浓度	93.15 $\pm$ 0.27##	90.14 $\pm$ 0.69##	89.10 $\pm$ 0.67#
F 值	765.02	555.79	676.40
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与模型组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.5 虎杖苷对 HUVECs 迁移能力的影响** 与对照组比较,模型组细胞的愈合率升高 [(48.68  $\pm$  1.08) % vs (36.36  $\pm$  1.56) %  $P < 0.05$ ];虎杖苷低、中、高浓度组细胞愈合率分别为 (42.06  $\pm$  0.91) %、(36.62  $\pm$  1.64) % 和 (18.59  $\pm$  1.57) %,与模型组比较,细胞迁移率分别下降了 13.60%、24.77% 和 68.81% ( $P < 0.05$ )。见图 2。

**2.6 虎杖苷对 HUVECs 侵袭能力的影响** 对照组、模型组和虎杖苷低、中、高浓度组的细胞侵袭数分别为 (72.33  $\pm$  2.89)、(141.00  $\pm$  1.00)、(109.67  $\pm$  3.79)、(88.33  $\pm$  1.53) 和 (64.33  $\pm$  3.05) 个。与对照组比较,模型组侵袭细胞数明显增多 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,虎杖苷低、中、高浓度组侵袭细胞数明显减少 ( $P < 0.001$ )。见图 3。

**2.7 虎杖苷对 HUVECs 中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量的影响** 与对照组比较,模型组细胞上清液中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量明显升高 ( $P < 0.001$ );与模型组比较,虎杖苷低、中、高浓度组 IL-6 和 TNF- $\alpha$  明显减少 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

**2.8 虎杖苷对 HUVECs 中 JAK2/STAT3 信号通路的影响** 与对照组比较,模型组 JAK2 和 STAT3 蛋白磷酸化水平均升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,虎杖苷低、中、高浓度组 JAK2 和 STAT3 蛋白磷酸化水平均降低 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

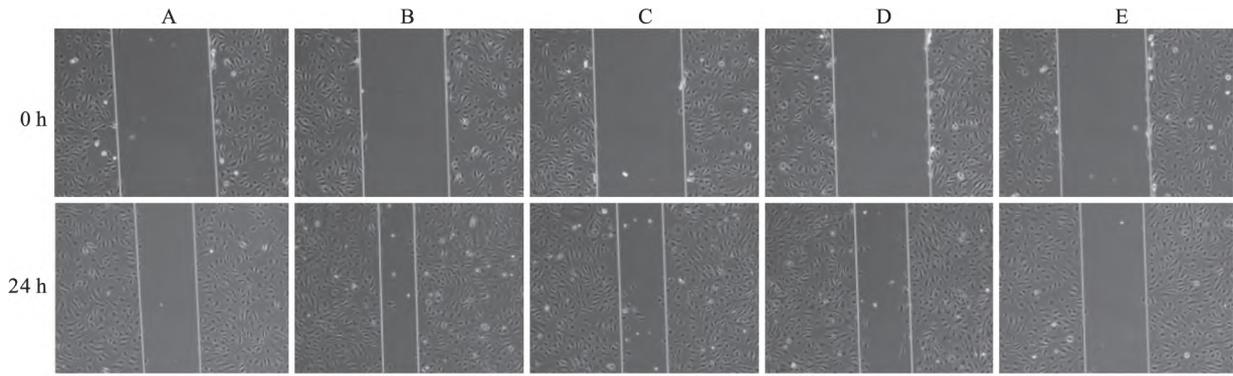


图2 虎杖苷对 HUVECs 迁移能力的影响 ×100

A: 对照组; B: 模型组; C: 虎杖苷低浓度组; D: 虎杖苷中浓度组; E: 虎杖苷高浓度组

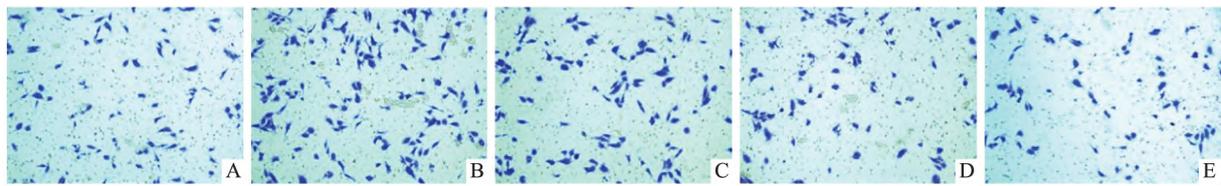


图3 虎杖苷对 HUVECs 侵袭能力的影响 ×100

A: 对照组; B: 模型组; C: 虎杖苷低浓度组; D: 虎杖苷中浓度组; E: 虎杖苷高浓度组

表4 各组 HUVECs 上清液中炎症因子表达量变化( n = 3  $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-6( ng/ml)	TNF- $\alpha$ ( pg/ml)
对照	0.05 $\pm$ 0.001	23.63 $\pm$ 1.61
模型	2.78 $\pm$ 0.07 <sup>****</sup>	33.19 $\pm$ 0.55 <sup>****</sup>
虎杖苷低浓度	2.38 $\pm$ 0.10 <sup>#</sup>	27.28 $\pm$ 1.00 <sup>###</sup>
虎杖苷中浓度	2.05 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>	24.09 $\pm$ 1.35 <sup>###</sup>
虎杖苷高浓度	1.75 $\pm$ 0.05 <sup>##</sup>	19.14 $\pm$ 0.35 <sup>###</sup>
F 值	842.51	69.66
P 值	<0.001	<0.001

与对照组比较: <sup>\*\*\*</sup> P < 0.001, <sup>\*\*\*\*</sup> P < 0.000 1; 与模型组比

较: <sup>#</sup> P < 0.05, <sup>##</sup> P < 0.01, <sup>###</sup> P < 0.001

### 3 讨论

血管内皮功能障碍是一种全身性疾病,是心血管病变的早期阶段,被认为是由内皮细胞损伤引起的<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>显示在高血糖、高血压和感染等不同危险因素诱导的炎症过程中,炎症生物标志物 IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达增加,会进一步加剧血管损伤,也已被证明可以预测心血管疾病的发展。因此,血管内皮炎症的控制预防各类血管疾病过程中起着至关重要的作用。本研究用 LPS 诱导炎症模型,虎杖苷明显改善单核细胞-内皮细胞的黏附及内皮细胞迁移和侵袭能力,并且抑制了 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的分泌,下调 JAK2 蛋白磷酸化水平和 STAT3 蛋白磷酸化水平,并呈浓度依赖性。

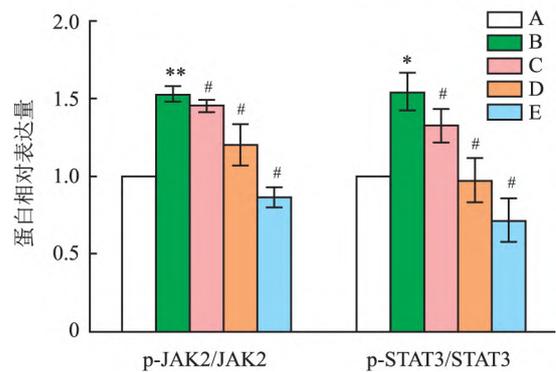
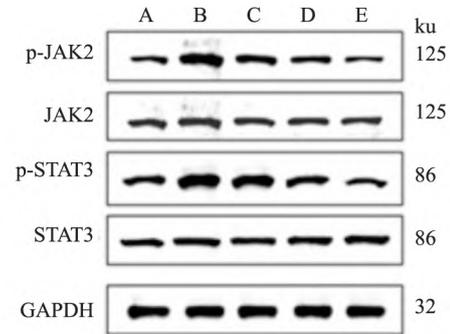


图4 虎杖苷对 HUVECs 中 JAK2/STAT3

信号通路蛋白表达的影响

A: 对照组; B: 模型组; C: 虎杖苷低浓度组; D: 虎杖苷中浓度组; E: 虎杖苷高浓度组; 与对照组比较: <sup>\*</sup> P < 0.05, <sup>\*\*</sup> P < 0.01; 与模型组比较: <sup>#</sup> P < 0.05

近年来随着心脑血管疾病的研究,STAT3 已被证明涉及到多种心血管疾病,包括动脉粥样硬化、心

脏肥大和心力衰竭<sup>[7]</sup>。JAK2 可以诱导 STAT3 的磷酸化,持续的 STAT3 磷酸化会导致黏附分子的异常表达<sup>[8]</sup>,在动脉粥样硬化的早期阶段,黏附分子主要促进单核细胞迁移,导致这些细胞黏附在内皮细胞上,进一步促进斑块的形成并影响斑块稳定性<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10]</sup>发现,通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路,能够减少促炎因子和黏附因子的释放,缓解动脉粥样硬化。虎杖苷是一种多酚类化合物,广泛存在于葡萄和花生等日常食品中<sup>[11]</sup>。据报道<sup>[12]</sup>,虎杖苷减轻炎症和氧化应激并维持了内皮细胞中线粒体动态平衡,抑制了内皮细胞损伤,改善了血管内皮功能。研究<sup>[13]</sup>表明,虎杖苷在动脉粥样硬化等多种心血管疾病中通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路的激活,抑制血管内皮细胞中细胞黏附分子蛋白和 mRNA 的表达,此外,还可以减少炎症因子的释放(如 IL-6 和 TNF- $\alpha$ ),起到抗炎的作用。

综上所述,本研究证实虎杖苷可通过 JAK2/STAT3 信号通路抑制单核细胞-内皮细胞的黏附及内皮细胞的迁移和侵袭,减少炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$ 水平,从而保护血管内皮的损伤,为动脉粥样硬化的临床治疗提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] Kong P, Cui Z Y, Huang X F, et al. Inflammation and atherosclerosis: Signaling pathways and therapeutic intervention [J]. *Signal Transduct Target Ther* 2022, 7(1): 131.
- [2] Zhang C, Liu J, Yuan C, et al. JAK2/STAT3 is associated with the inflammatory process in periapical granuloma [J]. *Int J Clin Exp Pathol* 2019, 12(1): 190-7.
- [3] Tian D, Meng J, Li L, et al. Hydrogen sulfide ameliorates senes-

- cence in vascular endothelial cells through ameliorating inflammation and activating PPAR $\delta$ /SGLT2/STAT3 signaling pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin* 2023, 55(9): 1358-69.
- [4] Ahmad P, Alvi S S, Iqbal D, et al. Insights into pharmacological mechanisms of polydatin in targeting risk factors-mediated atherosclerosis [J]. *Life Sciences* 2020, 254: 117756.
- [5] Shi L, Li Y, Xu X, et al. Brown adipose tissue-derived Nrg4 alleviates endothelial inflammation and atherosclerosis in male mice [J]. *Nat Metab* 2022, 4(11): 1573-90.
- [6] Dri E, Lampas E, Lazaros G, et al. Inflammatory mediators of endothelial dysfunction [J]. *Life (Basel)* 2023, 13(6): 1420.
- [7] Zouein F A, Booz G W, Altara R. STAT3 and endothelial cell-cardiomyocyte dialog in cardiac remodeling [J]. *Front Cardiovasc Med* 2019, 6: 50.
- [8] Wang L, Astone M, Alam S K, et al. Suppressing STAT3 activity protects the endothelial barrier from VEGF-mediated vascular permeability [J]. *Dis Model Mech* 2021, 14(11): dmm049029.
- [9] Kowara M, Cudnoch-Jedrzejewska A. Pathophysiology of atherosclerotic plaque development-contemporary experience and new directions in research [J]. *Int J Mol Sci* 2021, 22(7): 3513.
- [10] Fu X, Sun Z, Long Q, et al. Glycosides from buyang huanwu decoction inhibit atherosclerotic inflammation via JAK/STAT signaling pathway [J]. *Phytomedicine* 2022, 105: 154385.
- [11] Fakhri S, Gravandi M M, Abdian S, et al. The neuroprotective role of polydatin: Neuropharmacological mechanisms, molecular targets, therapeutic potentials, and clinical perspective [J]. *Molecules*, 2021, 26(19): 5985.
- [12] Shah W, Zhao Q, Wang S, et al. Polydatin improves vascular endothelial function by maintaining mitochondrial homeostasis under high glucose conditions [J]. *Sci Rep* 2023, 13(1): 16550.
- [13] Wu M, Li X, Wang S, et al. Polydatin for treating atherosclerotic diseases: A functional and mechanistic overview [J]. *Biomed Pharmacother* 2020, 128: 110308.

## Polydatin protects vascular endothelial cells by modifying the JAK2/STAT3 signaling pathway

Kong Wenwen<sup>1,2</sup>, Wei Huizhen<sup>3</sup>, Xu Yuanying<sup>3</sup>, Sha Wenjun<sup>3</sup>, Lu Jun<sup>3</sup>, Lei Tao<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Shanghai Putuo Central School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Shanghai 200062;

<sup>2</sup>The Fifth School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>3</sup>Dept of Endocrinology,

Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062)

**Abstract Objective** To study the protective effect of polydatin on lipopolysaccharide-induced injury of human umbilical vein vascular endothelial cells (HUVECs) through the protein Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) signaling pathway. **Methods** HUVECs were cultured *in vitro*, and 500 ng/ml LPS induced their injury and set as a model group; based on the model group, endothelial cells were intervened with different concentrations (10, 20, and 40  $\mu$ mol/L) of polydatin for 24 h, and set as polydatin low (下转第 1212 页)

renal interstitial fibrosis(CKD-RIF). **Methods** Mice were continuously fed with a diet containing 0.2% adenine for a duration of 9 weeks to establish mice models with CKD-RIF. By the end of the 9-week experimental periods, collected blood samples from the posterior orbital venous plexus of mice to measure renal functions and serum urate concentrations prior to euthanizing the mice. Hematoxylin-eosin (HE) staining and periodic acid-Schiff staining (PAS) were used to investigate the pathological alternations in kidney tissues. Masson's trichrome staining was used to observe the extent of renal fibrosis. Urate staining was used to detect urate deposition in renal tissues. Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of target molecules. Scratch tests were used to examine the migration abilities of cells treated with different concentrations of uric acid. **Results** The kidney function analysis showed that a significant increase in the levels of serum urea nitrogen ( $P=0.0064$ ), creatinine ( $P=0.0080$ ) and urate ( $P=0.0007$ ) in the CKD-RIF mice compared with the normal control group. The results of HE staining and PAS staining showed a significance of renal tubule injury and infiltration of inflammatory cells in the model group. Masson's trichrome staining showed that a marked increase in collagen deposition in the model group. The results of urate staining showed a significant presence of urate crystals in kidney tissue of the model group when compared to the control group. Animal tissue immunoblotting and immunohistochemistry analysis showed a significant increase in the expression levels of vimentin,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 in the model group in comparison to the control group. Conversely, in the model group, E-cadherin levels exhibited a dramatic reduction compared to the control group. The findings from the scratching tests showed that uric acid significantly enhanced cell migration. Western blot analysis showed a dramatic increase in the expression levels of vimentin and  $\alpha$ -SMA, while E-cadherin exhibited significant decrease in the cells subjected to uric acid treatment. **Conclusion** Urate stimulates the secretion of TGF- $\beta$ 1 by renal tubule epithelial cells and induces epithelial-mesenchymal transdifferentiation, thereby exacerbating renal interstitial fibrosis in CKD.

**Key words** urate; hyperuricemia; chronic kidney disease; renal interstitial fibrosis; epithelial-mesenchymal trans-differentiation

(上接第1205页)

concentration group, polydatin medium concentration group, and polydatin high concentration group, respectively; a control group was set as another group. CCK-8, monocyte-endothelial cell adhesion, scratch and Transwell assays were used to detect cell viability, adhesion, migration and invasive ability; ELISA was used to detect interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) levels in the cell supernatant; Western blot was used to detect the expression of proteins related to the JAK2/STAT3 signaling pathway levels of JAK2/STAT3 signaling pathway related proteins. **Results** Compared with the control group, the model group showed decreased cell survival ( $P < 0.01$ ), increased cell adhesion, migration and invasion ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), increased levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the cell supernatant ( $P < 0.001$ ) and increased levels of phosphorylation of JAK2 and STAT3 proteins in the cells ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, LPS damage to cells was attenuated after polydatin intervention, cell survival was increased in polydatin low-, medium- and high- concentration groups ( $P < 0.05$ ), cell adhesion, migration and invasion decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ), IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in cell supernatants decreased ( $P < 0.05$ ) and the levels of cellular JAK2 and STAT3 protein phosphorylation levels decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Polydatin seems to reduce the inflammatory injury of human umbilical vein endothelial cells induced by LPS, reducing the secretion of inflammatory factors and inhibiting the ability of cell adhesion, migration and invasion, which may be related to the down-regulation of JAK2/STAT3 signal pathway by polydatin.

**Key words** atherosclerosis; human umbilical vein endothelial cells; polydatin; JAK2/STAT3 signaling pathway