

N-乙酰半胱氨酸通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路对高糖诱导的内皮细胞损伤的保护作用

李潮生¹, 王振花¹, 李晓丽², 秦金金¹, 徐峥嵘¹, 陈军¹

(1. 南方医科大学深圳宝安医院心血管内科, 广东省深圳市 518100; 2. 南方医科大学深圳医院护理部, 广东省深圳市 518100)

[关键词] N-乙酰半胱氨酸; JAK2/STAT3 信号通路; 高血糖; 内皮细胞

[摘要] 目的 探讨 N-乙酰半胱氨酸(NAC)能否通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路对高糖诱导的内皮细胞损伤起保护作用。方法 体外分别应用不同浓度 NAC 对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)进行预处理, 筛选出 NAC 减轻高糖诱导的 HUVEC 细胞毒性的最佳浓度。使用最佳浓度的 NAC 预处理高糖诱导的 HUVEC, 通过 CCK-8 检测细胞存活率, Hoechst33258 核染色荧光显微镜照相法检测内皮细胞凋亡的形态学改变, Western blot 检测 JAK2/STAT3 信号通路的蛋白表达水平, DCFH-DA 检测细胞内活性氧水平, ELISA 检测相关炎症因子细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、核因子 κ B(NF- κ B)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白细胞介素 1β (IL- 1β)、IL-6 和 IL-8 的含量; 荧光探针 JC-1 检测线粒体膜电位的变化。结果 应用 7 mmol/L NAC 预处理 HUVEC 30 min 可明显减轻高糖诱导的 HUVEC 损伤, 使细胞存活率升高, 细胞凋亡数量减少, 细胞凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 表达减少, 胞内活性氧堆积及线粒体膜电位丢失减少($P < 0.01$)。NAC 能抑制高糖对 p-JAK2、p-STAT3 表达的上调作用($P < 0.01$), 同时可抑制高糖诱导的炎症反应, 使炎症因子 ICAM-1、NF- κ B、TNF- α 及白细胞介素 1β (IL- 1β)、IL-6 和 IL-8 的水平下降($P < 0.01$)。结论 NAC 能够通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路对高糖诱导的 HUVEC 损伤起到保护作用。

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

N-acetylcysteine protects endothelial cell from high glucose induced injury by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway

LI Chaosheng¹, WANG Zhenhua¹, LI Xiaoli², QIN Jinjin¹, XU Zhengrong¹, CHEN Jun¹

(1. Department of Cardiology, Shenzhen Bao'an Hospital Affiliated to Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518100; 2. Nursing Department, Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518100, China)

[KEY WORDS] N-acetylcysteine; JAK2/STAT3 signaling pathway; hyperglycemia; endothelial cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether N-acetylcysteine (NAC) can protect endothelial cells from high glucose induced injury by inhibiting JAK2 /STAT3 signaling pathway. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were pretreated with different concentrations of NAC in vitro, and the optimal concentration of NAC was selected to reduce the cytotoxicity of HUVEC induced by high glucose. HUVEC were pretreated with the best concentration of NAC, afterwards, the survival rate of HUVEC was measured by CCK-8, the morphological changes of endothelial cell apoptosis were detected by Hoechst33258 nuclear staining, the protein expression of JAK2/STAT3 signaling pathway was detected by Western blot, and the level of intracellular reactive oxygen species was detected by DCFH-DA, the levels of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), nuclear factor- κ B (NF- κ B), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β), IL-6 and IL-8 were detected by ELISA, and the changes of mitochondrial membrane potential were detected by fluorescence probe JC-1. **Results** NAC pretreatment of HUVEC for 30 min could significantly reduce the injury induced by high glucose, increase the cell survival rate, reduce the number of apoptosis, decrease the expression of cleaved Caspase-3, decrease the accumulation of intracellular reactive oxygen species and the loss of mitochon-

[收稿日期] 2021-04-26

[修回日期] 2021-06-21

[基金项目] 国家卫健委资助项目[(2014)780]; 深圳市宝安区科技创新项目资助(2016CX180)

[作者简介] 李潮生, 硕士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 510505698@qq.com。通信作者王振花, 硕士, 主治医师, 研究员, 研究方向为高血压与动脉粥样硬化机制, E-mail 为 1013652619@qq.com。

drial membrane potential ($P < 0.01$). NAC can inhibit the up-regulation of p-JAK2 and p-STAT3 expression induced by high glucose ($P < 0.01$), inhibit the inflammatory response induced by high glucose, and decrease the levels of inflammatory factors such as ICAM-1, NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 ($P < 0.01$). **Conclusion** NAC can protect HUVEC from high glucose induced injury by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway.

高血糖作为糖尿病血管并发症的主要致病因素,是导致血管内皮细胞损伤及功能障碍的重要原因,然而高血糖导致糖尿病血管内皮细胞损伤的相关分子机制尚未阐明。Janus 激酶 2/信号转导子及转录激活子 3 (Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3) 信号通路是细胞信号转导的重要通路之一,多个研究表明^[1-4], JAK2/STAT3 信号通路的激活参与糖尿病血管并发症的发生、发展,是心血管疾病及内皮细胞功能障碍的重要发病机制,但 JAK2/STAT3 通路在高糖诱导的内皮细胞损伤的相关机制仍有待阐明。N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 是一种含有巯基的抗氧化剂,具有干扰自由基生成、清除已生成的自由基、调节内皮细胞代谢活性等作用^[5-6]。但 NAC 是否在高糖所致内皮细胞损伤中起保护作用有待探索。本研究通过建立高糖诱导的内皮细胞损伤模型,探讨高糖对 JAK2/STAT3 信号通路蛋白表达的影响,通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路,进而验证 NAC 是否对高糖诱导的 HUVEC 损伤发挥保护作用。

1 材料和方法

1.1 细胞来源

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC), 购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

N-乙酰半胱氨酸、高糖 (HG) 购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; AG490 购自美国 MEC 公司, JAK2 抗体、STAT3 抗体购自美国 Proteintech 公司, p-JAK2 抗体、p-STAT3 抗体购自美国 CST 公司, Caspase-3 抗体、GAPDH 抗体购自武汉普健生物科技有限公司, 其他生物化学试剂均为进口或国产分析纯; Hoechst33258 染色试剂盒、BCA 蛋白定量检测试剂盒、活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术研究, CCK-8 检测试剂盒购自上海东仁化学科技有限公司; ELISA 检测试剂盒均购自武汉云克隆科技股份有限公司; 激光共聚焦显微镜成像系统、倒置相差显微镜、正置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司, 全

功能微孔板检测仪购自美国 PerkinElmer 公司, 全自动酶标仪购自美国 Thermo Scientific 公司, 凝胶成像系统购自美国 Bio-rad 公司。

1.3 HUVEC 的体外培养

细胞培养在 RPMI-1640 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 取出细胞培养瓶, 倒掉原培养液, 加入 2 mL 胰酶消化, 消化后加入等体积培养液用枪头吹散细胞至单个细胞。用移液枪将吹散的细胞悬液转移至 15 mL 离心管, 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清, 加入 1 mL 培养基重悬细胞, 分装 5 瓶, 按 1 : 5 传代。

1.4 实验分组

实验分为 6 组。①空白对照组 (Control): HUVEC; ②高糖损伤组 (HG): 应用 40 mmol/L 葡萄糖处理 HUVEC 24 h; ③NAC+HG 组: 使用不同浓度 NAC 预处理 HUVEC 30 min, 不更换培养基, 然后直接使用 40 mmol/L 葡萄糖作用 24 h; ④AG490+HG 组: 先用 20 μ mol/L AG490 预处理 HUVEC 30 min, 不更换培养基, 然后直接使用 40 mmol/L 葡萄糖作用 24 h; ⑤NAC 组: NAC 作用于 HUVEC 30 min, 不更换培养基, 然后直接使用 RPMI-1640 培养基作用 24 h; ⑥AG490 组: 先用 20 μ mol/L AG490 作用于 HUVEC 30 min, 不更换培养基, 然后直接使用 RPMI-1640 培养基作用 24 h。

1.5 CCK-8 检测 HUVEC 存活率

HUVEC 置于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养 24 h, 按上述实验分组予以不同处理。处理结束后, 在每孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液, 混匀, 37 °C 孵育 3~4 h 后, 向每孔中加入 10 μ L 终止液, 立即混匀, 使用酶标仪检测记录各孔吸光度 (A) 值, 波长设定为 450 nm。根据公式: 细胞存活率 (%) = (处理组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) \times 100%, 求出各组的细胞存活率, 重复 5 次。

1.6 Hoechst33258 核染色检测内皮细胞凋亡

经过实验分组不同的处理后 HUVEC 移入培养板中, 使盖玻片完全浸在培养液中; 将培养板在 5% CO₂ 水浴孵箱中 37 °C 孵育 2~3 天, 将已爬好细胞的玻片用 PBS 浸泡洗涤 3 次, 然后加 0.5 mL 的 4% 多聚甲醛固定液固定 10 min, 再用 PBS 浸泡洗涤玻片 3 次, 加入 0.5 mL 的 Hoechst33258 染色液,

染色 10 min; 吸出染色液, 再反复用 PBS 洗涤 4 次, 然后用干净的吸水纸将爬片上的液体完全吸干, 用含有抗荧光淬灭剂的封片液封片, 然后在共聚焦显微镜下观察采集图像。

1.7 Western blot 法检测 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 和 Caspase-3 蛋白的表达水平

收取每组中细胞沉淀, 加入 RIPA 裂解液, 在冰上持续裂解 30 min, 然后冰浴超声 3 min 后, 4 °C 冷冻离心机 12 000 r/min 离心 10 min, 用移液枪小心吸取离心得到的上清液至新的 EP 管中保存, 用 BCA 法测定蛋白的浓度。总蛋白经电泳分离转移至 PVDF 膜, 放于 5% 脱脂牛奶/TBST 封存液中, 室温摇床封闭 1 h。加入一抗 (JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Caspase-3 稀释至 1 : 1 000; GAPDH 稀释至 1 : 5 000), 过夜后用 PBST 洗涤 3 次, 加入二抗, 室温孵育 1 h, Enhanced Luminol Reagent 和 Oxidizing Reagent 发光液将 PVDF 膜显色, 最后用凝胶成像系统观察结果。

1.8 ELISA 检测炎症因子 ICAM-1、NF- κ B、TNF- α 及 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的含量

取实验各组细胞培养上清液各 5 份及细胞沉淀各 1 份 (上清液用于 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 及 ICAM-1 的检测; 细胞沉淀, 加入细胞裂解液裂解, 超声破碎, 高速离心收取上清, 用于 NF- κ B 的 ELISA 检测), 根据 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

1.9 荧光探针 DCFH-DA 检测细胞内活性氧含量

按照 1 : 1 000 的稀释比用无血清的培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 μ mol/L; 予以不同处理后, 去除细胞培养液, 加入适当体积稀释好的 DCFH-DA, 37 °C 培养箱孵育 20 min, 无血清的细胞培养液洗涤 3 次; 最后从培养箱中拿出爬片, 使用抗荧光淬灭封片剂进行封片。最后在荧光显微镜下观察和拍照, 并分析结果。

1.10 荧光探针 JC-1 检测线粒体膜电位的变化

用培养基稀释 JC-1 荧光染料探针, 至终浓度为 10 mg/L, 向经过上述实验分组不同出处理后的每组加入 0.5 mL 稀释好的 JC-1 探针, 置于 37 °C 的细胞培养箱中孵育 30 min, 孵育结束, 用 PBS 缓冲液反复洗涤 3 次, 最后用抗荧光淬灭封片剂进行封片, 显微镜下观察拍照并分析结果。

1.11 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS17.0 统计学软件进行统计分析和 GraphPad Prism 8 作图。组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 采用 SNK-

q 检验进行均数之间的两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NAC 和 AG490 减轻 40 mmol/L 高糖引起的 HUVEC 的细胞毒性

用 40 mmol/L 高糖处理 HUVEC, 会使细胞的存活率下降至 (26.4% \pm 1.9%), 显著增加细胞毒性, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在高糖处理前, 分别应用 1、3、5、7、9 mmol/L NAC 预处理 30 min, 均可以抑制高糖引起的细胞毒性, 增加细胞的存活率, 其中 7 mmol/L NAC 可使细胞存活率升至 (92.9% \pm 1.7%), 与 HG 组相比, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。因此, 本研究使用 7 mmol/L 作为后续实验的优选浓度 (图 1A)。如图 1B 所示, 与 7 mmol/L NAC 预处理相类似, 20 μ mol/L AG490 预处理细胞 30 min 可以显著降低高糖对细胞的毒性, 使细胞存活率上升至 (84.8% \pm 1.5%), 与 HG 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。7 mmol/L NAC 或 20 μ mol/L AG490 本身不会增加对细胞的毒性作用 (图 1B)。

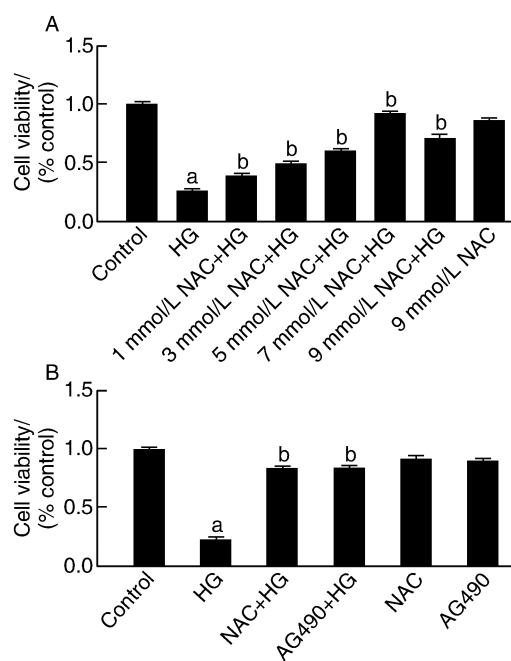


图 1. NAC 和 AG490 减轻 40 mmol/L 高糖引起的 HUVEC 的细胞毒性 ($n=5$)

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 HG 组比较。

Figure 1. NAC and AG490 reduced the cytotoxicity of HUVEC induced by 40 mmol/L hyperglycemia ($n=5$)

2.2 NAC 和 AG490 可以抑制高糖对 HUVEC 的凋亡作用

Hoechst 33258 核染色检测结果表明,与对照组比较,HG 组细胞数明显减少,细胞核呈碎块状致密浓染,核染色质凝集呈月牙形,表明高糖会导致细胞凋亡。使用 7 mmol/L NAC 或 20 μmol/L AG490

预处理高糖诱导的 HUVEC 30 min,与 HG 组相比,细胞数量增多,细胞核呈正常的蓝色居多,表明 7 mmol/L NAC 及 20 μmol/L AG490 均可以明显抑制高糖诱导的细胞凋亡。单独使用 7 mmol/L NAC 或 20 μmol/L AG490 处理 HUVEC 对细胞凋亡无明显影响(图 2)。

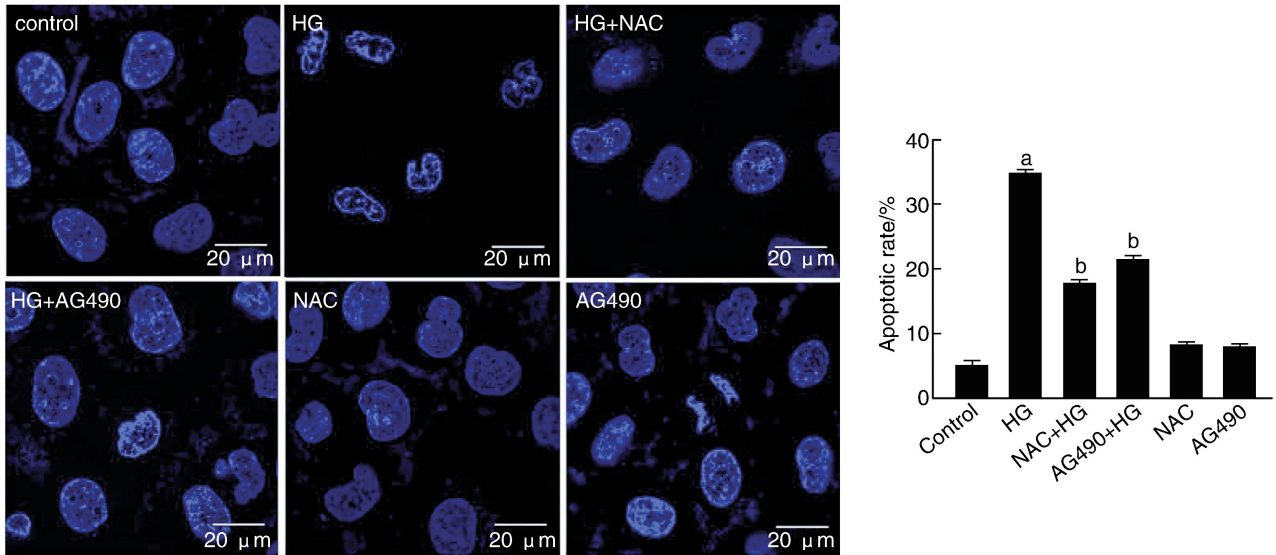


图 2. NAC 与 AG490 抑制高糖诱导的 HUVEC 凋亡 (n=5)

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 HG 组比较。

Figure 2. NAC and AG490 inhibit HUVEC apoptosis induced by high glucose (n=5)

2.3 NAC 和 AG490 抑制高糖诱导的 HUVEC p-JAK2 表达的上调

与对照组比较,HG 组 HUVEC p-JAK2 表达明显上升 ($P < 0.01$)。但是,在高糖处理 HUVEC 前,先用 7 mmol/L NAC 或 20 μmol/L AG490 预处理 30 min,再用 40 mmol/L 的高糖处理 24 h,p-JAK2 的表达水平明显下降,与 HG 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。单独使用 7 mmol/L NAC 或 20 μmol/L AG490 处理 HUVEC 对 JAK2/STAT3 通路中的 JAK 蛋白的磷酸化水平无明显影响(图 3)。

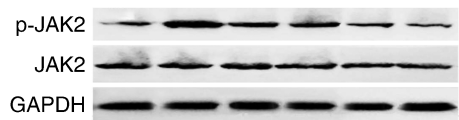


图 3. NAC 和 AG490 抑制高糖对 HUVEC p-JAK2 表达的促进作用 (n=5)

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 HG 组比较。

Figure 3. NAC and AG490 inhibit the expression of p-JAK2 in HUVEC induced by high glucose (n=5)

2.4 NAC 和 AG490 抑制高糖诱导的 HUVEC p-STAT3 表达的上调

HG 组 HUVEC p-STAT3 表达明显上升,在使用高糖处理 HUVEC 前,先用 7 mmol/L NAC 或 20 μmol/L AG490 预先处理 30 min,再用 40 mmol/L 的高糖处理 24 h,能使 p-STAT3 的表达水平明显下降,与 HG 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。单独使用 7 mmol/L NAC 或 20 μmol/L AG490 处理 HUVEC 对 JAK2/STAT3 通路中的 STAT3 蛋白的磷酸化水平无明显影响(图 4)。

2.5 NAC 和 AG490 减弱高糖诱导的 HUVEC 中 cleaved Caspase-3 蛋白表达的升高

与对照组比较,HG 组 HUVEC 中凋亡蛋白

cleaved Caspase-3 表达明显上升 ($P < 0.01$)。但是,在高糖处理 HUVEC 前,先用 7 mmol/L NAC 或 20 $\mu\text{mol/L}$ AG490 预处理 30 min,再用 40 mmol/L 的高糖处理 24 h,与 HG 组比较,HUVEC 中凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。单独使用 7 mmol/L NAC 或 20 $\mu\text{mol/L}$ AG490 处理 HUVEC 对 cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平无明显影响(图 5)。

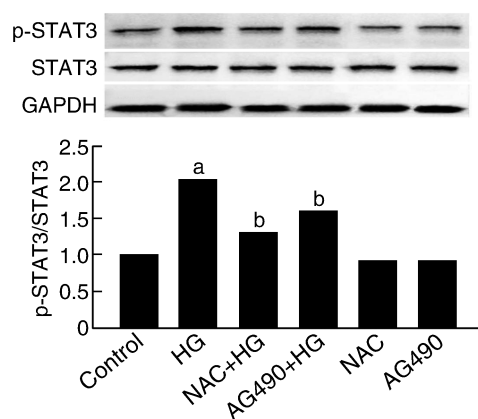


图 4. NAC 和 AG490 抑制高糖对 HUVEC p-STAT3 表达的促进作用 ($n=5$)

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 HG 组比较。

Figure 4. NAC and AG490 inhibited the expression of p-STAT3 in HUVEC induced by high glucose ($n=5$)

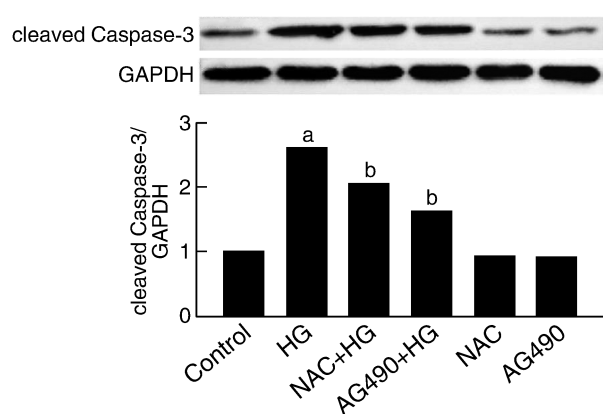


图 5. NAC 和 AG490 减弱高糖对内皮细胞凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 表达的促进作用 ($n=5$)

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 HG 组比较。

Figure 5. NAC and AG490 attenuate expression of cleaved Caspase-3 in endothelial cells induced by high glucose ($n=5$)

2.6 NAC 和 AG490 减轻高糖所致的 HUVEC 的氧化应激

DCFH-DA 染色检测结果表明,HG 组 HUVEC

内 DCFH 的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 从 100% 上升至 ($318.2\% \pm 10.2\%$),提示细胞内活性氧的水平明显升高,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。但是,在高糖处理 HUVEC 前,先用 7 mmol/L NAC 或 20 $\mu\text{mol/L}$ AG490 预处理 30 min,再用 40 mmol/L 的高糖处理 24 h,可以明显减少胞内 ROS 的堆积,MFI 强度分别下降至 ($177.5\% \pm 22.1\%$)、($155.8\% \pm 15.8\%$),与 HG 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。单独使用 7 mmol/L NAC 或 20 $\mu\text{mol/L}$ AG490 处理则对胞内 ROS 的生成无明显影响(图 6)。

2.7 NAC 和 AG490 抑制高糖所致的 HUVEC 的炎症反应

用 40 mmol/L 葡萄糖处理 HUVEC 可使胞内的炎症因子 ICAM-1、NF- κ B、TNF- α 及白细胞介素 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的含量明显增多,提示高糖可以导致炎症反应增强。在高糖处理 HUVEC 前,先用 7 mmol/L NAC 或 20 $\mu\text{mol/L}$ AG490 预处理 30 min,再用 40 mmol/L 的高糖处理 24 h,可以使炎症因子 ICAM-1、NF- κ B、TNF- α 及白细胞介素 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的含量显著下降,与 HG 组比较,差异有显著的统计学意义 ($P < 0.01$)。单独使用 7 mmol/L NAC 或 20 $\mu\text{mol/L}$ AG490 处理则对炎症因子 ICAM-1、NF- κ B、TNF- α 及白细胞介素 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的含量无明显影响(图 7)。

2.8 NAC 和 AG490 抑制高糖对 HUVEC 线粒体的损伤

JC-1 荧光探针检测结果表明,HG 组中 HUVEC 内 JC-1 单体绿色荧光强度显著增强,JC-1 与线粒体聚合物红色荧光相对较少,提示细胞内线粒体膜电位低,HUVEC 线粒体损伤严重。但是,在高糖处理 HUVEC 前,先用 7 mmol/L NAC 或 20 $\mu\text{mol/L}$ AG490 预处理 30 min,再用 40 mmol/L 的高糖处理 24 h,可以对抗这种线粒体损伤,与 HG 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。单独使用 7 mmol/L NAC 或 20 $\mu\text{mol/L}$ AG490 处理则不会对胞内线粒体膜电位造成影响(图 8)。

3 讨论

JAK2/STAT3 是一种细胞信号转导通路,它促进细胞的增殖、分化、炎症和凋亡,JAK2 属于蛋白酪氨酸激酶之一,是细胞增殖、分化、存活和衰老的重要因子,JAK2 的激活引起转录激活因子 STAT3 的磷酸化,磷酸化的 p-STAT3 形成二聚体并从胞质

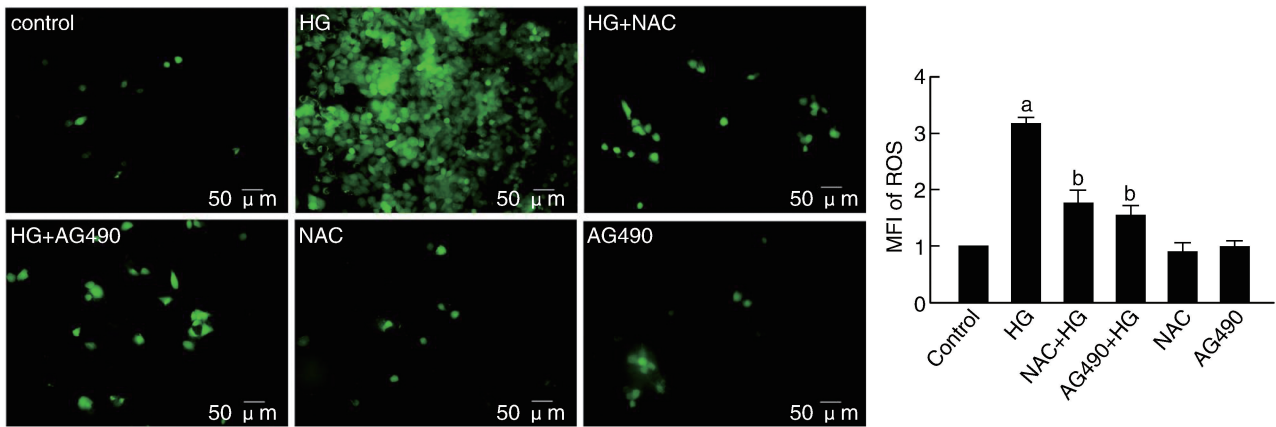


图 6. NAC 和 AG490 抑制高糖所致 HUVEC 胞内 ROS 的堆积 (n=5)
a 为 P<0.01, 与对照组比较; b 为 P<0.01, 与 HG 组比较。

Figure 6. NAC and AG490 inhibit intracellular ROS accumulation in HUVEC induced by high glucose (n=5)

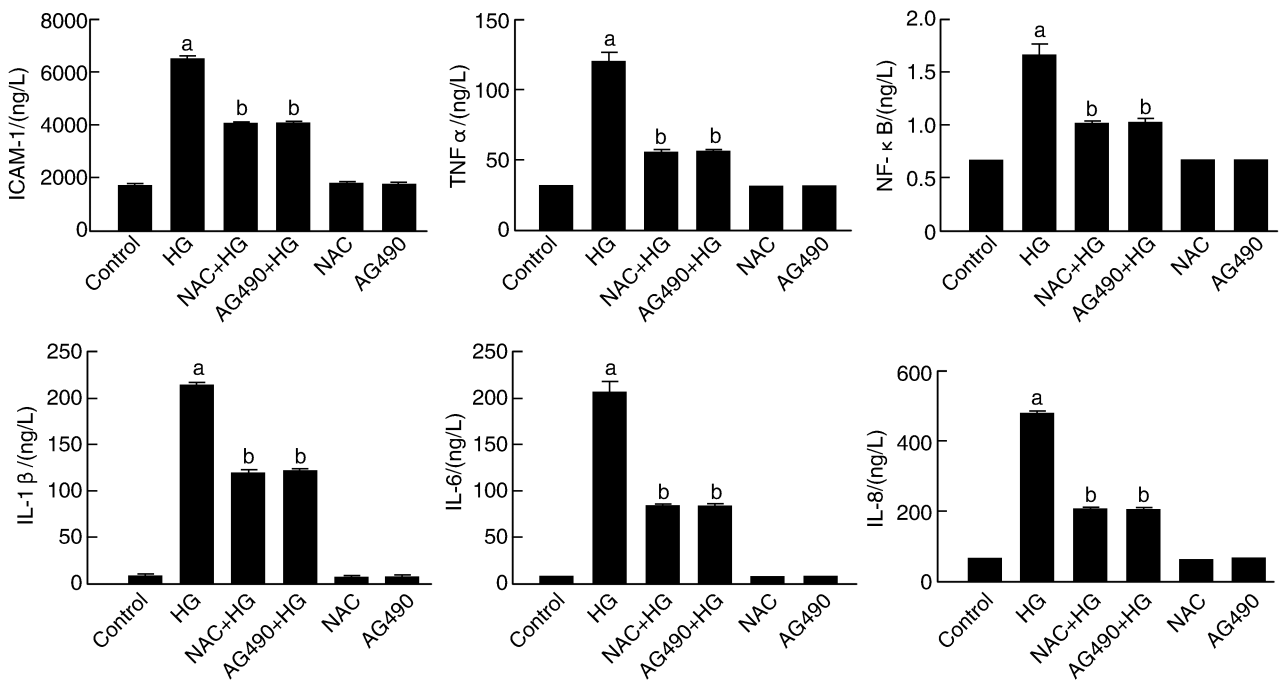


图 7. NAC 和 AG490 抑制高糖引起的炎症因子 ICAM-1、NF-κB、TNF-α 及白细胞介素 IL-1β、IL-6 和 IL-8 的释放作用 (n=5)
a 为 P<0.01, 与对照组比较; b 为 P<0.01, 与 HG 组比较。

Figure 7. NAC and AG490 inhibit the release of inflammatory cytokines ICAM-1, NF-κB, TNF-α and IL-1β, IL-6 and IL-8 induced by high glucose (n=5)

转运到细胞核,与相关序列结合,引起各种靶基因的表达^[7-9]。本研究探讨了 JAK2/STAT3 信号通路与高糖诱导的 HUVEC 损伤和炎症的可能机制及 NAC 对血管内皮的保护作用。

以往研究发现,下调 JAK2/STAT3 信号通路表达可改善糖尿病大鼠心肌纤维化^[10]。Manea 等^[11]发现,阻断 JAK/STAT 信号通路可抑制高血糖通过调节 ET-1 的升高导致的内皮细胞功能障碍。阻断

JAK2/STAT3 信号通路可以抑制高糖诱导的活性氧产生和下调血管内皮生长因子表达,提示阻断 JAK2/STAT3 信号通路可能成为未来血管疾病的潜在治疗靶点^[12-14]。如前所述,多项研究表明 JAK2/STAT3 信号通路在血管疾病及内皮细胞功能障碍中有重要意义,然而 JAK2/STAT3 通路在高糖诱导的内皮功能障碍中的作用机制仍有待阐明,我们的实验结果表明,高糖可以激活 JAK2/STAT3 信号通路,

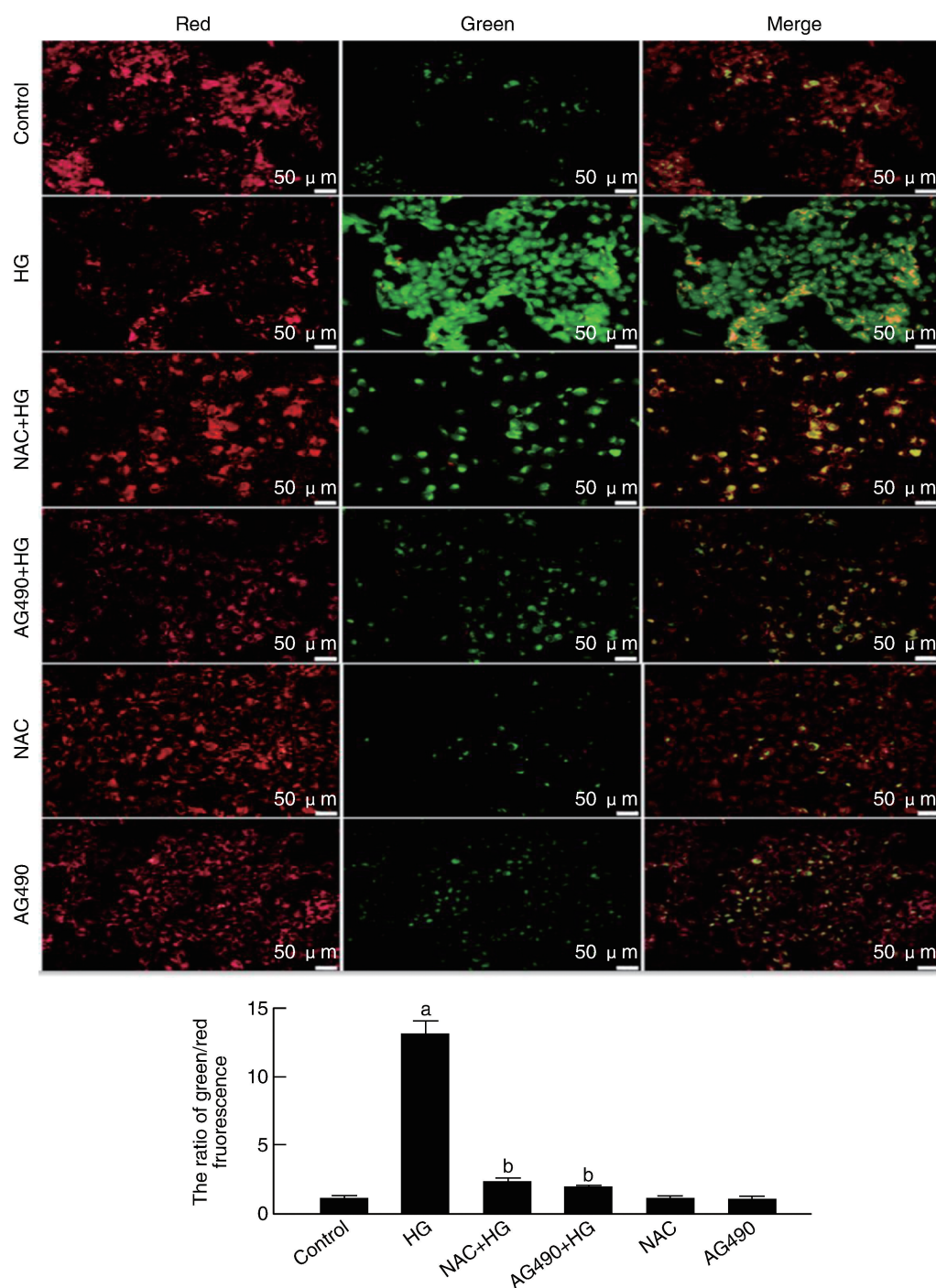


图 8. NAC 和 AG490 抑制高糖对 HUVEC 线粒体的损伤作用 ($n=5$)

a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 HG 组比较。

Figure 8. NAC and AG490 inhibit mitochondrial damage of HUVEC induced by high glucose ($n=5$)

表现为内皮细胞内 p-JAK2、p-STAT3 的表达水平明显上升。同时我们的实验证明经过高糖处理的 HUVEC, ICAM-1、NF- κ B、TNF- α 及白细胞介素 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 等炎症因子明显增多、细胞凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 显著增多、胞内活性氧生成明显增加及细胞存活率下降, 表明 JAK2/STAT3 信号通路的激活可能参与高糖诱导的 HUVEC 的损伤。最

终, 我们用 AG490 (一种 JAK2/STAT3 信号通路的专效抑制剂) 在高糖处理 HUVEC 前预处理后, 可明显减轻高糖诱导的损伤, 包括细胞凋亡、细胞毒性、线粒体损伤和氧化应激, 表现为 ICAM-1、NF- κ B、TNF- α 及 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 炎症因子生成减少、细胞存活率增加、细胞内活性氧生成减少及细胞凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 表达减少。间接证实高血糖可以

通过激活 JAK2/STAT3 信号通路导致 HUVEC 的损伤。

已有多项研究报道 NAC 对内皮细胞有保护作用^[6,15-17],主要研究集中在 NAC 可增加细胞内谷胱甘肽水平、清除活性自由基、抑制细胞凋亡等方面。临床队列研究表明 NAC 有助于改善代谢综合征,减轻内皮功能障碍^[18-19],但 NAC 对抗高糖所致的内皮损伤机制尚缺乏相关研究。本研究探讨 NAC 是否通过抑制 JAK2/STAT3 通路来保护 HUVEC 免受高糖诱导的损伤和炎症反应,结果表明 NAC 可保护 HUVEC 免受高糖诱导的凋亡,其作用机制主要表现为细胞凋亡减少和 Caspase-3 表达减少。NAC 可以通过抑制高糖所激活的 JAK2/STAT3 信号通路来减轻由 ICAM-1、NF- κ B、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 炎症因子趋化而加重的炎症反应及减弱胞内活性氧堆积引起的氧化应激,从而减少线粒体的损伤、下调细胞凋亡及增加内皮细胞存活率来对抗高糖诱导的 HUVEC 损伤。提示抑制 JAK2/STAT3 信号通路可能是 NAC 保护血管内皮细胞对抗高糖损伤的重要机制之一。

本研究证明 JAK2/STAT3 通路参与了高糖诱导的内皮细胞损伤和炎症反应,NAC 通过抑制 JAK2/STAT3 通路发挥对高糖诱导的内皮细胞损伤和炎症的保护作用。这些发现可能有助于开发新的治疗方法,以预防和治疗高血糖相关的血管内皮细胞损伤和炎症。

[参考文献]

- [1] YANG X, JIA J, YU Z, et al. Inhibition of JAK2/STAT3/SOCS3 signaling attenuates atherosclerosis in rabbit [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2020, 20(1): 133.
- [2] SIMA L J, MA X W. Effect of sevoflurane on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via JAK2-STAT3 pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3): 1350-1356.
- [3] LEI S, SU W, XIA Z Y, et al. Hyperglycemia-induced oxidative stress abrogates remifentanyl preconditioning-mediated cardioprotection in diabetic rats by impairing caveolin-3-modulated PI3K/Akt and JAK2/STAT3 signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019; 9836302.
- [4] YANG M, TIAN M, ZHANG X, et al. Role of the JAK2/STAT3 signaling pathway in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus with macrovascular complications [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(57): 96958-96969.
- [5] MILLEA P J. N-acetylcysteine: multiple clinical applications [J]. *Am Fam Physician*, 2009, 80(3): 265-269.
- [6] XIA Z, LIU M, WU Y, et al. N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha-induced human vascular endothelial cell apoptosis and restores eNOS expression [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 550(1/3): 134-142.
- [7] QI Q R, YANG Z M. Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3 [J]. *World J Biol Chem*, 2014, 5(2): 231-239.
- [8] CORCORAN R B, CONTINO G, DESHPANDE V, et al. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(14): 5020-5029.
- [9] AITTOMÄKI S, PESU M. Therapeutic targeting of the JAK/STAT pathway [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014, 114(1): 18-23.
- [10] LIU M, LI Y, LIANG B, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial fibrosis in diabetic rats through the JAK/STAT signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 1867-1876.
- [11] MANEA S A, MANEA A, HELTIANU C. Inhibition of JAK/STAT signaling pathway prevents high-glucose-induced increase in endothelin-1 synthesis in human endothelial cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 340(1): 71-79.
- [12] ZHENG Z, CHEN H, ZHAO H, et al. Inhibition of JAK2/STAT3-mediated VEGF upregulation under high glucose conditions by PEDF through a mitochondrial ROS pathway in vitro [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(1): 64-71.
- [13] SUN H H, FENG X M, WANG J C, et al. Allicin can suppress the activity of vascular endothelial cells probably by regulating JAK2/STAT3 pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(1): 435-441.
- [14] CHEN S, SUN Q, SUN D, et al. C-CBL is required for inhibition of angiogenesis through modulating JAK2/STAT3 activity in ROP development [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110856.
- [15] DEMIRALAY R, GURSAN N, ERDEM H. Regulation of nicotine-induced apoptosis of pulmonary artery endothelial cells by treatment of N-acetylcysteine and vitamin E [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2007, 26(7): 595-602.
- [16] ROSA L, KAGA A K, BARBANERA P O, et al. Beneficial effects of N-acetylcysteine on hepatic oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(4): 412-418.
- [17] PARK J H, KANG S S, JY K, et al. The antioxidant N-acetylcysteine inhibits inflammatory and apoptotic processes in human conjunctival epithelial cells in a high-glucose environment [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(9): 5614-5621.
- [18] RANI M, AGGARWAL R, VOHRA K. Effect of N-acetylcysteine on metabolic profile in metabolic syndrome patients [J]. *Metab Syndr Relat Disord*, 2020, 18(7): 341-346.
- [19] FAGHFOURI A H, ZAREZADEH M, TAVAKOLI-ROUZBEHANI O M, et al. The effects of N-acetylcysteine on inflammatory and oxidative stress biomarkers; a systematic review and Meta-analysis of controlled clinical trials [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 884: 173368.

(此文编辑 许雪梅)