新藤黄酸通过PTEN-PI3K/AKT/VEGF/eNOS信号通路干预人脐静脉内皮细胞血管生成的研究

高 俊[1,2],程 卉[1,2],李庆林[1,2]

(1.安徽中医药大学药学院,安徽 合肥 230012;
2.安徽中医药大学新安医学教育部重点实验室,安徽 合肥 230038)

[摘要]**目的** 探究PTEN-PI3K/Akt/VEGF/eNOS信号通路在新藤黄酸(gambogenic acid,GNA)抑制人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial, HUVECs)迁移中的作用。**方法** 倒置显微镜下观察HUVECs形态变化;Boyden chamber实验以及细胞划痕实验观察GNA对HUVECs迁移能力的影响;硝酸还原酶法检测NO水平;Western blot法检测GNA及LY29400预处理对HUVECs内磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶B(protein kinase B,AKT)、p-AKT表达水平的影响;HUVECs转染PTEN-siRNA后,RT-PCR实验检测VEGF mRNA的表达水平。**结果** GNA能有效抑制HUVECs迁移,其抑制效果与剂量相关($P<0.05$)。GNA和抑制剂LY294002以及L-NAME均能有效抑制NO的产生,且GNA+LY294002组、GNA+L-NAME组抑制效果更好($P<0.05$);Western blot检测结果显示,GNA上调PTEN蛋白表达水平,下调eNOS、p-PI3K、p-AKT蛋白表达水平($P<0.05$)。RT-PCR检测结果表明,PTEN-siRNA转染后,GNA能上调VEGF mRNA基因的表达水平($P<0.05$)。**结论** GNA通过PTEN-PI3K/Akt/VEGF/eNOS信号传导通路,抑制HUVECs迁移,阻止HUVECs血管生成。

[关键词]新藤黄酸;人脐静脉内皮细胞;血管生成;分子机制
[中图分类号]R285.5 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2021.01.021

细胞迁移也称为细胞爬行,是正常细胞的基本功能之一,表现为细胞头部伪足延伸、建立新的黏附、细胞体尾部收缩的交替进行,是机体正常生长发育的生理过程。细胞迁移涉及血管生成、癌症转移、炎症反应、动脉粥样硬化等过程。

肿瘤血管生成是从已存在的血管床中形成新生血管,是一个受众多生长因子调节的复杂的病理生理过程,多种细胞因子和细胞基质参与肿瘤的生长、转移、复发[1]。其过程包括:肿瘤细胞与正常血管内皮细胞相互作用;肿瘤细胞与细胞外基质相互作用;

基金项目:国家自然科学基金项目(81673650,81903859)
作者简介:高俊(1995-),女,硕士研究生
通信作者:李庆林(1968-),男,博士,教授,qinglin_lee@hotmail.com

Rg1 at different doses for 14 consecutive days. The mice were sacrificed on day 35, and the spinal cord was collected to observe pathological changes such as inflammatory cell infiltration and demyelination. Flow cytometry was used to measure Th1, Th17, and Treg subsets in the mouse spleen, and ELISA was used to measure the levels of interleukin-17A (IL-17A), interferon-γ (IFN-γ), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-10 (IL-10) in peripheral blood. **Results** Compared with the model group, the low-, middle-, and high-dose ginsenoside Rg1 groups had significant reductions in the score of nerve symptoms ($P<0.05$), the scores of inflammatory cell infiltration and demyelination in the spinal cord ($P<0.05$), and the percentages of $CD4^+$, $CD8^+$, Th1, and Th17 lymphocyte subsets in the spleen ($P<0.05$) and a significant increase in the percentage of Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) ($P<0.05$), as well as significant reductions in the levels of IFN-γ, IL-17A, and IL-16 in peripheral blood ($P<0.05$) and a significant increase in the level of IL-10 ($P<0.05$). Ginsenoside Rg1 exerted an effect in a significant dose-dependent manner. **Conclusion** Ginsenoside Rg1 can significantly improve clinical symptoms and reduce demyelination and inflammatory cell infiltration in the central nervous system in EAE mice, possibly by regulating the imbalance of Th17, Th1, and Treg subsets and inhibiting the expression of inflammatory cytokines.

[**Key words**] Ginsenoside Rg1; Autoimmune encephalomyelitis; Multiple sclerosis; Helper T cell; Regulatory T cell

相关细胞的参与及大量白细胞因子的调节，使得新生血管得以形成。抗肿瘤血管生成的主要机制：抑制促血管生成因子与配体的表达和结合及相应的信号传递途径，抑制血管内皮细胞的增殖、迁移，抑制基底膜的降解等[2]。

藤黄是藤黄科植物藤黄的干燥树脂，具有攻毒蚀疮、破血散结等功效。现代研究表明，新藤黄酸（gambogenic acid，GNA）为藤黄中的活性成分之一，具有良好的抗肿瘤活性。本课题组前期研究发现，GNA对多种肿瘤细胞如人乳腺癌MCF-7[3]和人肝癌BEL-7402细胞[4]的增殖均有抑制作用。近期实验研究[5]表明，GNA对肿瘤的血管生成、侵袭转移也具有一定的抑制作用。本研究选择人肺腺癌A549细胞和人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial，HUVECs）建立体外非直接接触式共培养体系，观察GNA对HUVECs迁移能力的影响，探讨GNA抗人肺腺癌A549细胞侵袭转移的作用及GNA影响血管生成的信号转导机制，为GNA的开发和应用提供理论依据。

1 试剂与材料

1.1 细胞株 人肺腺癌细胞株A549、HUVECs购于中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂 GNA（分子量为630.8，纯度＞98.0%，货号B50231）：上海源叶生物有限公司提供；胎牛血清（货号16140071）、DMEM高糖培养基（货号12100046）：美国GIBCO公司；Matrigel胶（货号356234）：美国BD公司；Boyden小室：美国康宁公司；聚碳酸酯膜孔径8.0 μm，NO检测试剂盒（货号A012）：南京建成生物工程研究所；LY294002、L-NAME（货号S0006）：江苏碧云天生物技术研究所；β-actin、eNOS抗体：美国Santa Cruz Biotechnology；NS-siRNA、第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因（phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten，PTEN）siRNA（序列：5′-GGCUAAGUGAAGAUGACAATT-3′；5′-UUGUCAUCUUCACUUAGCCTT-3′）：上海吉玛生物工程公司；Lipofectamine 2000™（货号11668-019）：美国Invitrogen公司。

1.3 仪器 细胞培养箱、－80 ℃冰箱：日本Sanyo公司；倒置显微镜：日本Olympus公司；超净工作台：浙江苏净净化设备有限公司；灭菌锅：日本Hirayama公司；高速冷冻离心机：德国Eppendorf；倒置荧光显微镜（DMI-6000B）：德国徕卡公司；垂直电泳仪：上海天能科技有限公司。

2 方法

2.1 倒置显微镜下观察GNA对HUVECs形态的影响 取对数生长期的HUVECs，消化和收集，将细胞密度调整为6×10^4 mL，接种于25 mL培养瓶。37 ℃、5% CO_2培养箱中培养24 h后，更换含有GNA的条件培养液，倒置显微镜下观察细胞并拍照。

2.2 改良的Boyden chamber检测GNA对HUVECs转移能力的影响 将Matrigel胶与预冷的无血清DMEM培养基按照1∶3的比例稀释加至Boyden小室中，每孔容积为50 μL，冰上操作。条件培养箱孵育5 h后，向上室加入200 μL的HUVECs悬液，下室中加入500 μL的A549细胞悬液，置于37 ℃，5% CO_2培养6 h后加药，继续培养24 h后取出小室，清洗上室残留细胞，4%多聚甲醛固定30 min后用0.1%结晶紫染液染色25 min，PBS洗涤3次，于倒置荧光显微镜下计数并拍照。

2.3 细胞划痕实验 于6孔板以每孔约2×10^5接种HUVECs，待细胞长满6孔板，用无菌200 μL加样枪头垂直于6孔板均匀划痕，用PBS轻洗细胞2～3遍后进行0 h取样，此为空白对照组，加入含不同浓度GNA的条件培养基，24 h后于倒置显微镜下取样。

2.4 NO水平的检测 采用硝酸还原酶法检测NO水平。不同药物组作用HUVECs 24 h后吸弃细胞培养液，收集细胞后超声裂解，2 000 r/min离心，收集上清，按照说明书的步骤操作，采用多功能酶标仪于550 nm处检测各组的吸光度。根据说明书提供的计算公式，计算细胞中NO的水平。

2.5 Western blot法检测GNA及LY29400预处理对HUVECs内磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidylinositol 3 kinase，PI3K）、p-PI3K、蛋白激酶B（protein kinase B，AKT）、p-AKT表达水平的影响 各组HUVECs分别处理24 h后，无菌细胞刮刮取细胞后，收集，离心提取总蛋白，进行BCA蛋白定量。每组样品总蛋白25 μg，经12% SDS-PAGE电泳，分离蛋白。转膜后5%脱脂奶粉常温封闭3 h，一抗（稀释比例1∶1 000）4 ℃孵育过夜。TBST漂洗3次，每次10 min，二抗常温孵育2 h，再用TBST漂洗3次，每次10 min，加入ECL发光底物，曝光，采用平均灰度值比较各组蛋白的表达水平。

2.6 PTEN-siRNA转染细胞，琼脂糖凝胶电泳检测血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）表达水平 取对数生长期的A549细胞1×10^6/mL接种至6孔板，每孔加入1.8 mL无抗生素的培养基，37 ℃、5% CO_2培养箱孵育过夜。弃去6

孔板中旧培养基，PBS洗2次，各孔加入不含抗生素培养液1.8 mL，按说明书操作配制好转染试剂并加入，轻轻混匀后培养箱培养6 h，倒置荧光显微镜下拍照，观察转染效率。提取总RNA，逆转录PCR，分别将VEGF、β-actin扩增产物（见表1）各5 μL与1 μL 6×SDS上样缓冲液混匀后，用移液器加样，电压90 V，电泳约40 min，取胶放置在凝胶成像系统上，紫外光下拍照，采用Biocapt MV软件测定吸光度（A），采用Image J分析各组条带光密度值，并采用Graphpad 5.0作图。

表1 VEGF、β-actin基因引物表

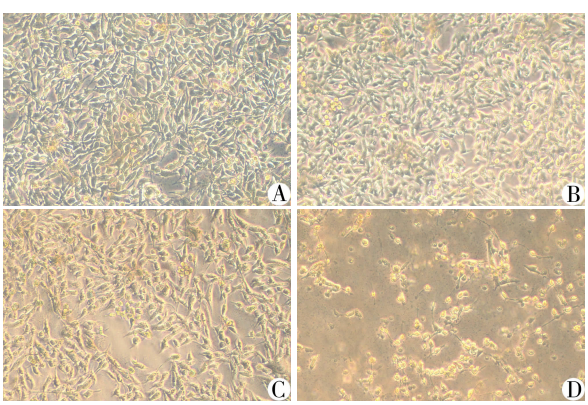
PCR引物	引物序列	扩增片段长度/bp
VEGF	上游引物：5′-CCTTCCCGAGGCACAGAGAG-3′	341
	下游引物：5′-GGAGGGCAGAGCTGAGTGTT-3′	
β-actin	上游引物：5′-GCCGGGACCTGACTGACTAC-3′	471
	下游引物：5′-CGGAGTACTTGCGCTCAGGA-3′	

2.7 统计学方法 实验重复3次并采用Graph Pad Prism 6等软件进行数据统计分析。结果采用“均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）”进行统计学描述。多组间均数比较采用单因素方差分析。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 条件培养基的制备 将A549细胞2×10^5接种于75 mL培养瓶，12 h后取培养液，离心后取上清，再加入10%胎牛血清，−20 ℃冻存备用。使用前加入不同浓度的GNA，此为HUVECs的条件培养基。

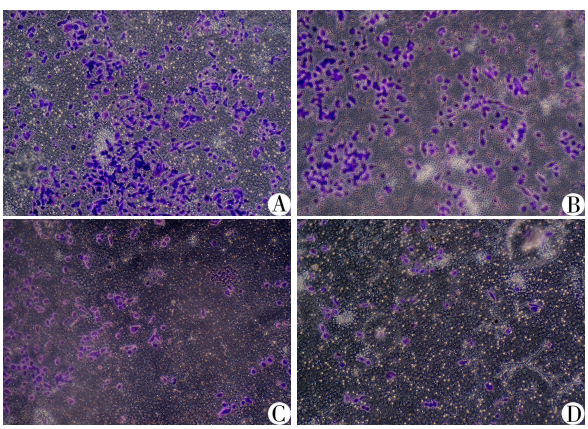
3.2 倒置显微镜下观察GNA对HUVECs形态的影响 空白对照组中细胞贴壁牢固，折光性强；1 μmol/L GNA组细胞核固缩变圆，体积变小，贴壁细胞有少量出现漂浮现象；2 μmol/L GNA组少数细胞体积变大，折光性明显变弱，细胞呈现坏死状态；4 μmol/L GNA组大量细胞固缩变圆，漂浮于培养液中。见图1。



注：A.空白对照组；B.1.0 μmol/L GNA组；C.2.0 μmol/L GNA组；D.4.0 μmol/L GNA组

图1 倒置显微镜下观察GNA对HUVECs形态的影响（10×20倍）

3.3 Boyden小室实验观察GNA对HUVECs迁移的影响 倒置荧光显微镜下观察发现，接种至Boyden小室上室中的细胞，5～6 h后开始贴附于凝固的Matrigel胶上，24 h后倒置荧光显微镜下观察，与空白对照组相比，2 μmol/L GNA组和50 μmol/L LY294002组可以降低细胞迁移数目（$P<0.05$）；与空白对照组及2 μmol/L GNA组相比，2 μmol/L GNA＋50 μmol/L LY294002组能够显著降低细胞迁移数目（$P<0.05$）。见图2、表2。



注：A.空白对照组；B.2 μmol/L GNA组；C.50 μmol/L LY294002组；D.2 μmol/L GNA＋50 μmol/L LY294002组

图2 Boyden小室实验观察GNA对HUVECs迁移的影响（结晶紫染色，10×20倍）

表2 Boyden小室实验观察GNA对HUVECs迁移的影响（$\bar{x}\pm s$）

组 别	n	迁移率/%
空白对照	3	236.33± 4.04
2 μmol/L GNA	3	142.33±10.02*
50 μmol/L LY294002	3	127.33± 5.03*
2 μmol/LGNA＋50 μmol/L LY294002	3	75.33±11.15*#

注：与空白对照组比较，*$P<0.05$；与2 μmol/L GNA组比较，#$P<0.05$

3.4 细胞划痕实验观察GNA对HUVECs划痕愈合的影响 实验24 h后，GNA各处理组较空白对照组划痕愈合变慢（$P<0.05$）。结果表明，GNA可抑制HUVECs的划痕愈合，并且呈一定的剂量依赖性，见图3、表3。

3.5 GNA对不同抑制剂处理的HUVECs中NO水平的影响 LY294002及L-NAME抑制剂作用

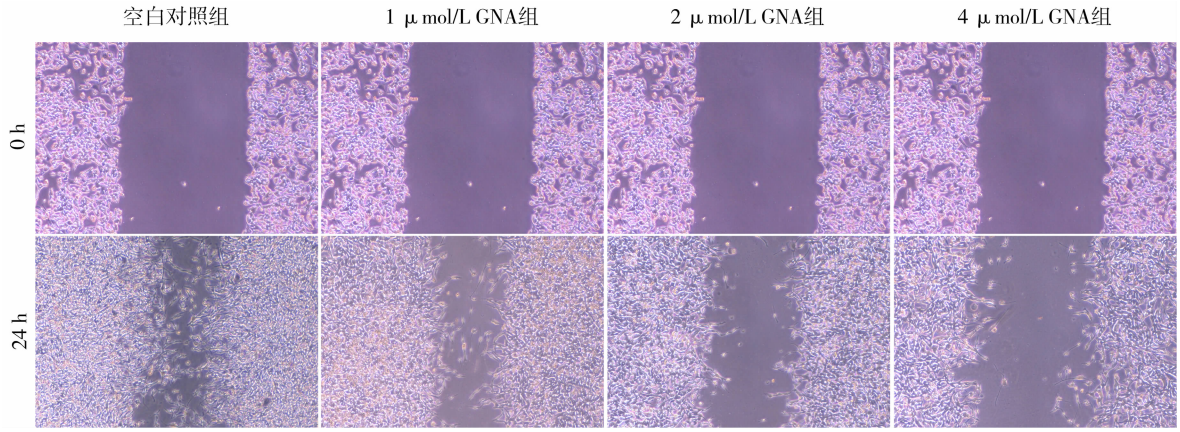


图3 细胞划痕实验观察GNA对HUVECs划痕愈合的影响(结晶紫染色,10×20倍)

表3 细胞划痕实验观察GNA对HUVECs划痕愈合的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	迁移率/%
空白对照	3	85.98±10.71
1 μmol/L GNA	3	58.58±11.29*
2 μmol/L GNA	3	34.94± 6.16*#
4 μmol/L GNA	3	15.83± 4.88*#△

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与1 μmol/L GNA组比较,# $P<0.05$;与2 μmol/L GNA组比较,△ $P<0.05$

HUVECs后,采用硝酸还原酶法测定NO含量,判断GNA对内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)活力的影响。实验结果显示,2 μmol/L GNA组能够显著降低NO水平($P<0.05$),与PI3K抑制剂LY294002组效果接近,且2 μmol/L GNA+50 μmol/L LY294002组NO水平更低($P<0.05$)。见表4。与空白对照组比较,GNA组、L-NAME组NO水平显著降低($P<0.05$),且GNA+L-NAME组NO水平更低($P<0.05$)。见表5。

表4 GNA及PI3K抑制剂对细胞培养上清中NO水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	NO/(μmol/L)
空白对照	3	6.58±0.41
2 μmol/L GNA	3	3.29±0.42*
LY294002	3	2.47±0.41*
2 μmol/L GNA+50 μmol/L LY294002	3	1.10±0.63*#

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与2 μmol/L GNA组比较,# $P<0.05$

表5 GNA及L-NAME对HUVECs上清中NO水平的影响($\bar{x}\pm s$)

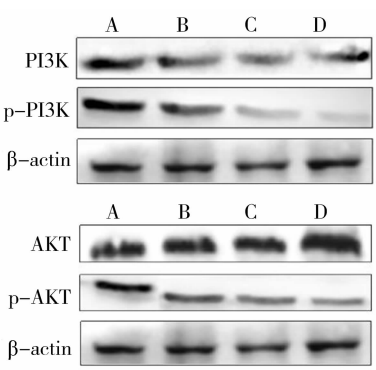
组 别	n	NO/(μmol/L)
空白对照	3	8.00±1.37
2 μmol/L GNA	3	4.90±0.52*
L-NAME	3	3.92±0.52*
L-NAME+2 μmol/L GNA	3	1.68±0.34*#

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与2 μmol/L GNA组比较,# $P<0.05$

3.6 Western blot实验检测结果

3.6.1 Western blot法检测GNA对HUVECs内PI3K、p-PI3K、AKT和p-AKT蛋白表达水平的影响 Western blot实验结果显示,GNA作用HUVECs后,p-PI3K和p-AKT蛋白表达水平随着药物浓度的增加呈剂量依赖性下降($P<0.05$);而PI3K和AKT蛋白表达水平基本不变。见图4、表6。

3.6.2 GNA对LY294002预处理HUVECs相关蛋白表达水平的影响 为了进一步研究GNA对HUVECs迁移的信号转导通路,本研究检测PI3K/AKT的上游负性调控蛋白PTEN的表达水平,见图5。同时,采用PI3K特异性抑制剂LY294002和不同浓度的GNA作用HUVECs 24 h后,检测eNOS的含量变化,见图6。结果表明,细胞内PTEN蛋白的表达水平随着GNA浓度的增加而呈浓度依赖性增加($P<0.05$),见表7。2 μmol/L GNA作用HUVEC 24 h后,eNOS表达水平下降($P<0.05$),而PI3K抑制剂LY294002与GNA联合使用具有协同作用,促进eNOS蛋白表达水平进一步降低($P<0.05$),见表8。



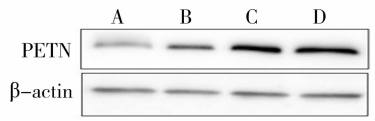
注:A.空白对照组;B. 1μmol/L GNA组;C. 2 μmol/L GNA组;D. 4 μmol/L GNA组

图4 GNA对HUVECs内p-PI3K、PI3K和p-AKT、AKT蛋白表达水平的影响

表6 GNA对HUVECs内p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT蛋白相对表达水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	PI3K	AKT	p-PI3K	p-AKT	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
空白对照	3	0.73±0.02	1.00±0.01	0.73±0.01	0.75±0.04	1.00±0.04	0.75±0.03
1 μmol/L GNA	3	0.72±0.02	0.98±0.03	0.51±0.02*	0.51±0.01*	0.71±0.03*	0.52±0.02*
2 μmol/L GNA	3	0.73±0.04	1.01±0.04	0.35±0.03*#	0.43±0.03*#	0.47±0.06*#	0.42±0.02*#
4 μmol/L GNA	3	0.71±0.04	1.04±0.05	0.10±0.02*#△	0.24±0.04*#△	0.19±0.03*#△	0.23±0.03*#△

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与1 μmol/L GNA组比较,# $P<0.05$;与2 μmol/L GNA组比较,△ $P<0.05$



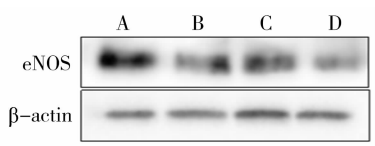
注:A.空白对照组;B. 1 μmol/L GNA组;C. 2 μmol/L GNA组;D. 4 μmol/L GNA组

图5 GNA对HUVECs血管生成相关蛋白PTEN表达水平的影响

表7 GNA对HUVECs血管生成相关蛋白PTEN相对表达水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	PTEN
空白对照	3	0.11±0.01
1 μmol/L GNA	3	0.39±0.04*
2 μmol/L GNA	3	0.60±0.13*#
4 μmol/L GNA	3	0.73±0.01*#

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与1 μmol/L GNA组比较,# $P<0.05$



注:A.空白对照组;B. 2 μmol/L GNA组;C. 50 μmol/L LY294002组;D. 2 μmol/L GNA+50 μmol/L LY294002组

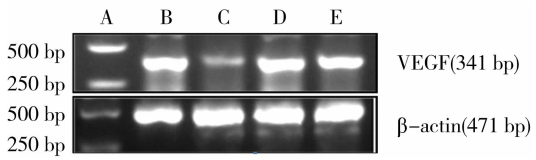
图6 GNA对HUVECs血管生成相关蛋白eNOS表达水平的影响

表8 GNA对HUVECs血管生成相关蛋白eNOS相对表达水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	eNOS
空白对照	3	1.61±0.11
2 μmol/L GNA	3	1.23±0.08*
50 μmol/L LY294002	3	1.59±0.10*
50 μmol/L LY294002+2 μmol/L GNA	3	0.12±0.05*#

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与2 μmol/L GNA组比较,# $P<0.05$

3.7 GNA对转染PTEN-siRNA的HUVEC中VEGF mRNA表达水平的影响 电泳图和Image J软件的分析结果显示,与空白对照组比较,GNA组能下调VEGF mRNA的表达水平($P<0.05$),而与GNA组比较,PTEN-siRNA组及PTEN-siRNA+GNA组VEGF mRNA的表达水平上调($P<0.05$)。见图7、表9。



注:A. maker;B.空白对照组;C. GNA组;D. PTEN-siRNA组;E. PTEN-siRNA+GNA组

图7 GNA对转染PTEN-siRNA的HUVEC中VEGF mRNA表达水平的影响

表9 GNA对转染PTEN-siRNA的HUVEC中VEGF mRNA相对表达水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	VEGF
空白对照	3	0.85±0.09
GNA	3	0.48±0.05*
PTEN-siRNA	3	0.87±0.04#
PTEN-siRNA+GNA	3	0.88±0.08#

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与GNA组比较,# $P<0.05$

4 讨论

PI3K家族是细胞内重要的信号传导分子,参与调控多种信号通路[6]。PI3K/AKT信号通路在人类肿瘤谱中广泛失调,IA型PI3K和其下游分子AKT所组成的信号通路不仅调节肿瘤细胞的增殖和存活,与肿瘤的血管新生过程、侵袭转移行为也密切相关。PI3K/AKT信号通路受多种因子的调节,主要为负调节分子,如PTEN等抑癌蛋白。PTEN所编码的蛋白能使PIP3去磷酸化,阻断PI3K/AKT信号通路,从而促进细胞凋亡、抑制细胞增殖、抑制肿瘤血管新生和肿瘤迁移等作用。Jiang等[7]研究表明,PI3K/AKT信号通路参与了血管生成,PETN可抑制这种效应。而PI3K/AKT通路与VEGF之间的关联在肿瘤血管生成中发挥了重要作用[8]。研究表明,VEGF在多种肿瘤中高度表达[9],其通过诱导内皮细胞增殖、迁移,促进血管外基质降解等途径促进肿瘤血管生成[10]。VEGF可提高血管通透性,促进血浆蛋白渗漏形成血管外纤维蛋白基质,为内皮细胞迁移提供网架;在多种细胞因子和蛋白酶协同作用下,使迁移出的内皮细胞延伸形成新生血管;经活化的蛋白水解酶降解肿瘤边缘细胞外基质,促使肿瘤细胞外渗而形成转移[11-13]。

PI3K/AKT不仅是机体内重要的信号调控途径之一，并且是调控eNOS的关键信号途径之一[14-15]。目前研究[16-17]表明，第一个明确由AKT作用的促进血管形成的物质是eNOS。其表达与肿瘤侵袭和迁移、肿瘤血管分化和形成关系密切[18]。AKT调节eNOS活性，与血管生成关系密切，在VEGF的作用下，活化的AKT和eNOS结合，eNOS被磷酸化丝氨酸激活，产生NO，从而引起血管舒张、血管重塑和血管生成。Ma等[19]研究发现，PI3K/AKT的负调节分子PTEN可通过PI3K/AKT/VEGF/eNOS信号通路抑制肿瘤血管生成。

本课题组前期研究结果表明，GNA能够下调HUVECs的p-PI3K，p-AKT蛋白的表达水平且呈剂量依赖性，与对照组比较，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。同时，采用PI3K特异性抑制剂LY294002处理细胞后，Western blot法检测表明VEGF的蛋白表达水平显著下调，提示GNA抑制血管生成与PI3K/AKT信号通路有关，且下游通路中VEGF起着非常关键的作用。本实验在此基础上，通过抑制剂LY294002预处理HUVECs，Western blot法检测HUVECs内PTEN、eNOS蛋白水平的表达变化，结果显示，PTEN蛋白表达水平随着GNA的浓度增加而增加，eNOS蛋白表达水平下降，且GNA 2 μmol/L与LY294002联用后作用更强。用Boyden chamber小室分析GNA以及LY294002对HUVEC转移能力的影响，发现GNA以及LY294002都能抑制细胞转移。细胞划痕愈合实验结果表明，不同浓度GNA均可抑制血管内皮细胞迁移，且呈剂量依赖性。采用LY294002和eNOS特异性抑制剂L-NAME处理细胞，硝酸还原酶法检测eNOS的表达水平，结果表明，2 μmol/L GNA和LY294002联用以及2 μmol/L GNA和L-NAME联用均能显著降低eNOS的含量；RT-PCR结果表明，沉默PTEN基因会促进VEGF表达水平的上调。

综上所述，GNA可能通过PTEN-PI3K/AKT/VEGF/eNOS通路影响HUVECs的迁移和血管形成。

参考文献：

[1] CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease[J]. Nat Med, 2003,9(6):653-660.

[2] FERRARA N,KERBGEL R S. Angiogenesis as a therapeutic target[J]. Nature,2005,438(7070):967-974.

[3] 谢晨烨，张凤，程卉，等. 新藤黄酸联合阿霉素诱导人乳腺癌MCF-7细胞凋亡的研究[J]. 安徽中医药大学学报，2015,34(1):51-55.

[4] 展凡，王玉涵，王萌，等. 新藤黄酸抑制人肝癌细胞BEL-7402自噬作用研究[J]. 安徽中医药大学学报，2020,39(3):46-50.

[5] 程卉，王云龙，苏婧婧，等. 新藤黄酸体外抗肺癌血管生成的作用机制研究[J]. 中国中药杂志，2018,43(21):4311-4316.

[6] FANG J,DING M,YANG L,et al. PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis[J]. Cell Signal,2007,19(12):2487-2497.

[7] JIANG B H, ZHENG J Z, AOKI M. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2000, 97(4):1749-1753.

[8] De AMICIS F, AQUILA S, MORELLI C, et al. Bergapten drives autophagy through the up-regulation of PTEN expression in breast cancer cells[J]. Mol Cancer,2015,14:130.

[9] BALARATNASINGAM C, DHRAMI-GAVAZI E, MCCANN J T, et al. Aflibercept:a review of its use in the treatment of choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration[J]. Clin Ophthalmol, 2015,9:2355-2371.

[10] MAHENDRA G,KUMAR S,ISAYEVA T,et al. Antiangiogenic cancer gene therapy by adeno-associated virus 2-mediated stable expression of the soluble FMS-like tyrosine kinase-1 receptor[J]. Cancer Gene Ther, 2005,12(1):26-34.

[11] HUANG M, HUANG B, LI G, et al. Apatinib affect VEGF-mediated cell proliferation, migration, invasion via blocking VEGFR2/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways in cholangiocarcinoma cel[J]. BMC Gastroenterol,2018,18(1):169.

[12] JUNG Y D,KIM M S,SHIN B A,et al. EGCG,a major component of green tea,inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells[J]. Br J Cancer,2011,84(6):844-850.

[13] YU W,HEGARTY J P,BERG A,et al. NKX2-3 transcriptional regulation of endothelin-1 and VEGF signaling in human intestinal microvascular endothelial cells[J]. PLoS One,2011,6(5):e20454.

[14] TAGASHIRA H,MATSUMOTO T,TAGUCHI K,et al. Vascular endothelial σ1-receptor stimulation with SA4503 rescues aortic relaxation via Akt/eNOS signaling in ovariectomized rats with aortic banding[J]. Circ J,2013,77(11):2831-2840.

[15] YU J,WANG Q,WANG H,et al. Activation of liver X receptor enhances the proliferation and migration of endothelial progenitor cells and promotes vascular repair

through PI3K/Akt/eNOS signaling pathway activation [J]. Vascul Pharmacol,2014, 62(3):150-161.

[16] ZHENG Y Q,WU Z Z,YI F,et al. By activating Akt/eNOS bilobalide B inhibits autophagy and promotes angiogenesis following focal cerebral ischemia reperfusion [J]. Cell Physiol Biochem,2018,47(2):604-616.

[17] AHMAD K A,ZE H,CHEN J C,et al. The protective effects of a novel synthetic β-elemene derivative on human umbilical vein endothelial cells against oxidative stress-induced injury:involvement of antioxidation and PI3k/Akt/eNOS/NO signaling pathways[J]. Biomed Pharmacother,2018,106:1734-1741.

[18] 李牧,王丽,刘海莉,等.姜黄素通过降低一氧化氮合酶水平抑制宫颈癌HeLa细胞的侵袭和转移[J].南方医科大学学报,2013,33(12):1752-1756.

[19] MA J,SAWAI H,OCHI N,et al. PTEN regulate angiogenesis through PI3K/Akt/VEGF signaling pathway in human pancreatic cancer cells[J]. Mol Cell Biochem,2009,331(1-2):161-171.

(收稿日期:2020-08-05)

Gambogenic Acid Intervenes Against Angiogenesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells via the PTEN-PI3K/AKT/VEGF/eNOS Signaling Pathway

GAO Jun[1,2], *CHENG Hui*[1,2], *LI Qing-lin*[1,2]

(1. *School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei* 230012, *China*; 2. *Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei* 230038, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of the PTEN-PI3K/Akt/VEGF/eNOS signaling pathway in the inhibition of the migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by gambogenic acid (GNA). **Methods** An inverted microscope was used to observe the morphological changes of HUVECs; Boyden chamber experiment and wound-healing assay were used to observe the effect of GNA on the migration ability of HUVECs; the nitrate reductase method was used to measure the level of nitric oxide (NO); Western blot was used to measure the effect of GNA and LY29400 pretreatment on the expression levels of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), protein kinase B (AKT), phosphorylated AKT (p-AKT) in HUVECs; after HUVECs were transfected with PTEN-siRNA, RT-PCR was used to measure the mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF). **Results** GNA effectively inhibited the migration of HUVECs in a dose-dependent manner ($P<0.05$). GNA and the inhibitors LY294002 and L-NAME effectively inhibited the production of NO, and the GNA+LY294002 group and the GNA+L-NAME group had a significantly better inhibitory effect ($P<0.05$). Western blot showed that GNA upregulated the protein expression of PTEN and downregulated the protein expression of endothelial nitric oxide synthase, p-PI3K, and p-AKT ($P<0.05$). RT-PCR showed that after PTEN-siRNA transfection, there was a significant increase in the mRNA expression of VEGF ($P<0.05$). **Conclusion** GNA inhibits the migration of HUVECs and prevents angiogenesis in HUVECs via the PTEN-PI3K/Akt/VEGF/eNOS signaling pathway.

[**Key words**] Gambogenic acid; Human umbilical vein endothelial cell; Angiogenesis; Molecular mechanism