

## • 实验研究 •

# 红花苷对模拟微重力下细胞迁移的作用

李 静<sup>1</sup> 陈 军<sup>2</sup> 钱彦方<sup>1</sup> 石 菲<sup>3</sup> 杜挺媛<sup>3</sup> 孙喜庆<sup>3</sup>

(1. 海军总医院中医科, 北京市海淀区阜成路 6 号, 100048;

2. 陕西中医学院针灸推拿系; 3. 中国人民解放军第四军医大学航空航天医学系)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102678)

\* 通讯作者: lijing713@hotmail.com, (010)66951417

**[摘 要]** 目的 观察红花苷修复模拟微重力下人脐静脉内皮细胞(HUVECs)细胞迁移抑制的作用并探讨其机制。方法 MTT 比色法选出红花苷干预 HUVECs 的最佳浓度; 模拟失重-2D 回转仪模拟失重培养 HUVECs, 分为正常重力对照组、模拟微重力组、红花苷微重力组。采用透膜侵袭小室模型检测细胞迁移; 激光共聚焦显微镜观察红花苷干预后细胞骨架纤维状肌动蛋白(F-actin)的形态及对黏着斑(FAs)的影响。结果 与正常重力对照组比较, 模拟微重力组细胞迁移数下降( $P < 0.01$ ); 红花苷微重力组较模拟微重力组细胞迁移数增加( $P < 0.05$ )。正常重力对照组的 F-actin 呈现明显极化、微丝集结成束, 模拟微重力可导致 F-actin 骨架重构, 极化下降并呈现弥散特点; 而红花苷微重力组的 F-actin 排列有序, 伪足较模拟微重力组增多, 方向性显著增强。模拟微重力组较正常重力对照组 FAs 数量(VN)、面积(VA)及 FAs 到细胞边缘距离(DS)显著降低( $P < 0.05$ ); 红花苷微重力组较模拟微重力组 VN、VA、DS 显著升高( $P < 0.05$ )。结论 红花苷可改善模拟微重力作用导致的 HUVECs 迁移抑制, 修复模拟微重力作用导致的 HUVECs 骨架 F-actin 的重构, 改善 FAs 的生成及定位。

**[关键词]** 模拟微重力; 人脐静脉内皮细胞; 红花苷; 细胞骨架; 细胞迁移

Effect of Carthamin on the Cell Migration Induced by Modeled Microgravity

LI Jing<sup>1</sup>, CHEN Jun<sup>2</sup>, QIAN Yanfang<sup>1</sup>, SHI Fei<sup>3</sup>, DU Tingyuan<sup>3</sup>, SUN Xiqing<sup>3</sup>

(1. Navy General Hospital, Beijing 100048; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine; 3. The Fourth Military Medical University)

**ABSTRACT** **Objective** To observe the repairing effect of Carthamin on the inhibition of cell migration induced by modeled microgravity (MMG) and its mechanism. **Methods** The proper concentration of Carthamin was got with MTT assay. The human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured and were divided into the normal gravity (NG) control group, MMG group and MMG+Carthamin group. Transwell was used to detect cell migration. Confocal microscopy and image analysis were used to analyze the modifications of the cytoskeleton network and FAs structure. **Results** Comparing with the NG group, the number of cell migration was significantly decreased in the MMG group ( $P < 0.01$ ). Comparing with the MMG group, the number of cell migration was significantly increased in the MMG+Carthamin group ( $P < 0.05$ ). In the NG group, F-actin was obviously polarized and microfilaments were assembled into a bundle. The cytoskeleton of HUVECs was refined, F-actin polarization was significantly decreased and microfilaments staining showed diffuse in the MMG group. Comparing with the MMG group, the F-actin of HUVECs was orderly arranged, pseudopodium was increased and the directivity was enhanced in the MMG+Carthamin group. Comparing with the NG group, the number of FAs (VN) and area (VA) and distance (DS) to cell edge in the MMG group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Comparing with the MMG group, the VN, VA and DS were significantly increased in the MMG+Carthamin group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Carthamin could repair the blocked HUVECs migration induced by MMG and it is associated with refinement of F-actin and FAs structure.

**Keywords** modeled microgravity; human umbilical vein endothelial cells; Carthamin; cytoskeleton; cell migration

空间飞行机体面临复杂的重力变化, 血管功能出现剧烈异常导致心血管功能失调(CD)频繁发生, 直接威胁飞行安全。CD 主要表现为面色青紫或苍白、口唇青紫、舌紫暗可见瘀斑、脉细弦, 与中医“血瘀”证相似。红花及单体成分具有较强的抗氧化自由

基损伤和抗脂质过氧化损伤, 改善血液流变性状等作用<sup>[1-2]</sup>。本研究观察红花苷对模拟微重力(MMG)环境下人脐静脉内皮细胞(HUVECs)细胞迁移及形态学的影响, 探讨红花苷对重力变化导致的内皮细胞功能失调的逆转或修复机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器

模拟失重-2D 回转仪(中国航天航空工业研究所产品),倒置显微镜 IX51 及激光共聚焦显微镜 FV1000(日本 Olympus 公司产品)。

### 1.2 药品和试剂

红花苷[陕西信瑞生物科技有限公司生产,陕卫药健(2009)第 1089 号];低糖型 DMEM 培养基、胎牛血清(FES,美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶干粉、胶原酶 I 型、鬼笔环肽 FITC-phalloidin、Hoechst33258、Cy-3 标记二抗(美国 Sigma 公司);多聚赖氨酸、L-谷氨酰胺(北京中杉金桥生物技术有限公司)、黏着斑蛋白 anti-vinculin(美国 Bioworld)。

### 1.3 HUVECs 培养及分组

酶消化法培养 HUVECs,获得脐带后 PBS 冲洗,止血钳夹闭静脉一端,另一端注入 0.25% 胰蛋白酶消化,37℃ 恒温箱 10 min 后收集消化液,加入含 20% FES 的 DMEM 培养基终止消化反应,离心后重悬细胞,离心、弃上清,接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。24 h 后更换培养液,以后每 48 h 换液 1 次。通过倒置显微镜形态观察,约 3~5 天细胞生长融合成单层细胞。0.25% 的胰蛋白酶消化,本研究采用第 2~5 代细胞。

模拟失重培养 HUVECs,采用模拟失重-2D 回转仪对 HUVECs 进行模拟失重培养, HUVECs 长至融合后,消化培养于含有 2.5 cm×2.5 cm 盖玻片的 6 孔培养板中,调整细胞密度为 2×10<sup>5</sup>/ml;将盖玻片插入特制的 Fixing 铁架上,每个铁架可插 4 个玻片,并将铁架放置于小室中。小室充满体积分数 90% 的液体,5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 培养 4~6 h;然后将液体注满小室,排出所有气泡,回转 48 h。参考文献[3~5]方法,实验分为 3 组:正常重力对照组采用相同操作,最后一步不用安装至回转器上,模拟微重力组即采用模拟失重-2D 回转仪模拟失重培养 HUVECs;红花苷微重力组即模拟失重培养 HUVECs 加入红花苷。

### 1.4 红花苷干预 HUVECs 最佳浓度筛选

用 10% FBS 得培养液配成单个细胞悬液,以每孔 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 200 μl,加入红花苷(浓度为 100、10、1 μg/ml),培养 3~5 天后加入 MTT 溶液 20 μl,继续孵育 4 h,终止培养。每孔加 150 μl DMSO,振荡 10 min,使结

晶物充分溶解。在酶标仪上测定各孔光吸收值,记录标准曲线。结果显示,10 μg/ml 为最佳干预浓度,100 μg/ml 细胞出现增殖抑制。

### 1.5 检测指标及方法

1.5.1 HUVECs 迁移检测 采用 Transwell 小室检测细胞迁移,小室的培养上室和下室相通,中间以膜滤器(滤孔直径为 8 μm)相隔,下室底采用多聚赖氨酸包被的 2.5 cm×2.5 cm 盖玻片铺底,观察细胞透过基膜的数量从而评价迁移能力;各组细胞计数 2×10<sup>5</sup>/ml,制备爬片行不同重力干预,均培养 48 h 消化后 1 g 重力重悬细胞,以 5×10<sup>5</sup>/ml 接种于 Transwell 上室中;含 2% FBS 的 DMEM 培养基,5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 培养基进行培养。孵育 24 h 后, PBS 冲洗后取出盖玻片,置于 95% 甲醇固定, HE 染色,倒置显微镜下观察。

1.5.2 HUVECs 骨架纤维状肌动蛋白(F-actin)、黏着斑(FAs)检测 各组的细胞爬片采用-20℃ 甲醇固定, TBS-0.5% TritonX-100 透膜处理 10 min, 2% BSA 封闭, F-actin 染色采用鬼笔环肽 FITC-phalloidin(5 μg/ml)一步法免疫荧光染色,室温 30 min。FAs 染色依据 Eli Zamir<sup>[6]</sup>的方法,爬片置于 3% 多聚甲醛+0.1% TritonX-100 混合固定液, TBS 清洗, 2% BSA 封闭,一抗 anti-vinculin 4℃ 孵育过夜, TBS 清洗; Cy-3 标记二抗 37℃ 孵育 2 h, TBS 清洗; 10 μg/ml Hoechst 复染,封片。分析 FAs 参数: FAs 平均数量(VN)、FAs 平均面积(VA)、FAs 到细胞边缘平均距离(DS)。所有荧光染色采用激光共聚焦显微镜观察,于 60 倍水镜下进行观察,据情况进行 Zoom 放大(3 倍),每个视野下的观察标尺为 10 μm。FAs 参数参照文献[6~7]处理,分析计算采用高通量激光共聚焦荧光滤过法。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析,计量数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 各组细胞迁移比较

表 1 示,与正常重力对照组比较,模拟微重力组、红花苷微重力组细胞迁移数明显下降( $P < 0.01$ );红花苷微重力组细胞迁移数较模拟微重力组增多( $P < 0.05$ )。

### 2.2 各组 HUVECs 骨架 F-actin 变化比较

正常重力对照组细胞极化明显, F-actin 呈现放射状,集结成束,并可见到细胞周围密集的伪足;模

拟微重力组 F-actin 的极化显著下降,并且微丝染色呈现出弥散的特点;红花苷微重力组 F-actin 明显排列有序,伪足较模拟微重力组增多,并且方向性显著增强,其标尺为  $10\ \mu\text{m}$ 。

表 1 各组细胞迁移比较(个,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 样本数 | 细胞数                        |
|---------|-----|----------------------------|
| 正常重力对照组 | 8   | $36.00 \pm 1.19$           |
| 模拟微重力组  | 8   | $19.00 \pm 1.51^*$         |
| 红花苷微重力组 | 8   | $28.00 \pm 2.12^{*\Delta}$ |

注:与正常重力对照组比较,  $*P < 0.01$ ;与模拟微重力组比较,  $\Delta P < 0.05$

## 2.3 各组 HUVECs FAs 参数比较

与正常重力对照组相比,模拟微重力组 HUVECs FAs 的 VN、VA、DS 均显著下降( $P < 0.05$ );与模拟微重力组比较,红花苷微重力组的 VN、VA、DS 下降( $P < 0.05$ )。

表 2 各组 HUVECs FAs 参数比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 样本数 | VN(个)                       | VA( $\mu\text{m}^2$ )       | DS( $\mu\text{m}$ )        |
|---------|-----|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 正常重力对照组 | 8   | $267.00 \pm 7.12$           | $90.43 \pm 7.56$            | $39.42 \pm 4.23$           |
| 模拟微重力组  | 8   | $133.00 \pm 1.56^*$         | $66.21 \pm 8.15^*$          | $21.34 \pm 2.56^*$         |
| 红花苷微重力组 | 8   | $198.00 \pm 3.12^{*\Delta}$ | $80.57 \pm 10.33^{*\Delta}$ | $31.33 \pm 3.11^{*\Delta}$ |

注:与正常重力对照组比较,  $*P < 0.05$ ;与模拟微重力组比较,  $\Delta P < 0.05$

## 3 讨论

空间飞行导致机体面临复杂的重力变化,会出现多种多样的不适与失调,如骨质疏松、贫血综合征等,其中由于血管功能剧烈异常导致 CD 发生的最为频繁,也直接威胁飞行安全<sup>[8-9]</sup>。Hayashi 等<sup>[10]</sup>1991 年提出内皮功能障碍这个概念,认为内皮细胞受损是导致多种血管系疾病的重要原因。研究发现<sup>[11]</sup>,在 MMG 时可导致血管内皮细胞增殖能力,与细胞周期滞留于 G2/M 期有关。

当机械力(包括失重)作用细胞,包膜发生扭曲激活细胞膜上的 FAs 受体并将胞外的机械刺激通过细胞骨架传递于细胞内<sup>[12]</sup>。骨架以及其包膜与细胞外基质的黏附点可能是物理力学刺激的关键部位,评价失重作用后 FAs 的形态与功能的改变可为揭示生物体对外力的反应提供依据。本研究采用 Zamir E 等提出的半通量激光共聚焦演算对 FAs 进行半定量监测,以期解释 MMG 影响内皮功能及选择对抗策略的深层次机制。

我们发现 MMG 可致 HUVECs 迁移抑制,证

明 MMG 下内皮功能的障碍与细胞迁移受限直接相关。所谓活血祛瘀、通则不痛,本研究将中医活血中药单体红花苷引入研究中,以期观察红花苷是否有促进细胞活力与迁移的作用。同时,本研究还发现  $10\ \mu\text{g/ml}$  的红花苷可显著改善 HUVECs 在 MMG 迁移抑制状态。众所周知,两个核心因素决定着细胞的迁移,结构正常的细胞纤维状肌动蛋白骨架以及成熟的 FAs 结构;在红花苷微重力组,细胞 F-actin 的伪足较模拟微重力组多,这可能是红花苷改善细胞迁移抑制的机制之一。当细胞的 FAs 面积大并且数量多时,细胞的迁移旺盛,然而当 FAs 面积小并且数量少时,细胞的迁移则被抑制<sup>[13]</sup>。MMG 作用后, FAs 的数量和面积都明显下降,这可能是 HUVECs 在 MMG 下现已抑制的原因之一。FAs 的成熟还体现在各个黏着点定位的准确,本研究发现 MMG 作用 48 h 后, FAs 平均到包膜的距离明显不同于正常重力对照组, MMG 可能通过影响 FAs 定位而影响 FAs 的成熟。然而,通过与红花苷共同孵育, HUVECs 形成了较为成熟的 FAs,数量及面积都显著提高,提示这可能与其促迁移作用直接相关。

红花单体具有直接保护损伤内皮的作用,羟基红花黄色 A 可促使缺氧条件下内皮细胞增殖率升高<sup>[14]</sup>;可抑制缺氧复氧条件下 P 选择素(P-selectin)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的过度表达<sup>[15]</sup>。研究表明,将不同浓度的红花苷分别作用在常养(21%)和缺氧(10%)状态下的内皮细胞,发现在这两种状态下特别是缺氧情况下红花苷对内皮细胞有促进增殖的作用,并且呈现浓度依赖性。本研究进一步发现,红花苷可修复 MMG 导致内皮细胞迁移抑制的作用,可以提高细胞动力,因此红花苷可能成为对抗机体在失重条件下产生心血管失调的又一策略。

## 参考文献

- [1] 汪洋. 红花注射液对高血压病患者氧自由基及红细胞流变性的影响[J]. 西北药学杂志, 2006, 23(10): 21-23.
- [2] 李颖. 红花注射液治疗原发性高血压的临床研究[J]. 湖南中医学院学报, 2006, 26(9): 3-4.
- [3] Choi EM, Kim GH, Lee YS. Carthamus tinctorius flower extract prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced dysfunction and oxidative damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. Phytother Res, 2009, 19(7): 223-229.
- [4] Nakano K, Sekino Y, Yomo N, et al. High-performance liquid chromatography of Carthamin, safflower yellow A and a precursor of Carthamin. Application to the investigation

- of an unknown red pigment produced in cultured cells of safflower[J]. J Chromatogr, 1988, 438(1): 61—72.
- [5] Saito K, Kanehira T, Horimoto M, et al. Biosynthesis of Carthamin in florets and cultured cells of *Carthamus tinctorius* Biologia [J]. Plantarum, 1993, 35 (4): 537—546.
- [6] Zamir E, Katz BZ, Aota S, et al. Molecular diversity of cell-matrix adhesions[J]. J Cell Sci, 1999, 112 (11): 1655—1669.
- [7] Guignandon A, Lafage-Proust MH, Usson Y, et al. Cell cycling determines integrin-mediated adhesion in osteoblastic ROS 17/2. 8 cells exposed to space-related conditions[J]. FASEB J, 2001, 15(11): 2036—2038.
- [8] Hargens AR, Richardson S. Cardiovascular adaptations, fluid shifts, and countermeasures related to space flight [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2009, 169 (Suppl 1): 30—33.
- [9] 孙喜庆, 李莹辉, 姜世忠. 重力生理学理论与实践[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2009: 132—133.
- [10] Hayashi T, Ishikawa T, Naito M, et al. Low level hyperlipidemia impairs endothelium-dependent relaxation of porcine coronary arteries by two mechanisms. Functional change in endothelium and impairment of endothelium-dependent relaxation by two mediators[J]. Atherosclerosis, 1991, 87(1): 23—38.
- [11] Wang YC, Zhang S, Du TY, et al. Clinorotation upregulates inducible nitric oxide synthase by inhibiting AP-1 activation in human umbilical vein endothelial cells[J]. J Cell Biochem, 2009, 107(2): 357—363.
- [12] Sultan C, Stamenovic D, Ingber DE. A computational tensegrity model predicts dynamic rheological behaviors in living cells[J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(4): 520—530.
- [13] Pirone DM, Liu WF, Ruiz SA, et al. An inhibitory role for FAK in regulating proliferation: a link between limited adhesion and RhoA-ROCK signaling[J]. J Cell Biol, 2006, 174 (2): 277—288.
- [14] 连泽勤, 赵大龙, 朱海波. 羟基红花黄色素 A 上调低氧状态下血管内皮细胞中缺氧诱导因子-1 $\alpha$  的表达[J]. 药学报, 2008, 6 (5): 43—44.
- [15] 张建初, 杨卫兵, 夏蕾, 等. 红花黄素对大鼠肺动脉内皮细胞 P-选择素及 ICAM-1 表达的影响[J]. 中国微循环, 2007, 12 (1): 11—12.
- (收稿日期: 2012—04—25; 修回日期: 2012—08—12)
- [编辑: 洪 涛]

## 中国第七届中医、中西医结合暨非药物治疗防治 心脑血管病、糖尿病、肿瘤高级论坛通知

由中国人健康科技促进会医药科技专业委员会、《世界中医药》杂志社联合主办的“中国第七届中医、中西医结合暨非药物治疗防治心脑血管病、糖尿病、肿瘤高级论坛”拟于 2013 年 5 月在重庆市召开。

### 1. 会议征文与研讨内容

(1) 中医药治疗心脑血管病的理论研究及临床经验; (2) 中医、中西医结合治疗心脑血管病的新疗法、新进展; (3) 中医药治疗心脑血管病的实验研究; (4) 针灸推拿等非药物治疗治疗心脑血管病的体会; (5) 中医、中西医结合治疗糖尿病的理论研究及临床进展; (6) 糖尿病、肿瘤及心脑血管病的中医诊疗规范; (7) 中医药、中西医结合治疗肿瘤的基础及临床研究; (8) 中医、中西医结合抗肿瘤的理论与临床探讨; (9) 名老中医经验和民间中医验方防治心脑血管病、糖尿病、肿瘤经验总结; (10) 抗肿瘤中药的研究与开发; (11) 肿瘤止痛及晚期肿瘤患者生存质量与养生方法研究; (12) 中医非药物治疗的基础研究和理论研究探讨; (13) 中医非药物治疗在临床中的应用研究与总结; (14) 针灸在各科临床的经验总结; (15) 推拿按摩及其他治疗方法在各科临床的运用; (16) 非药物康复疗法经验总结; (17) 中风后遗症的中医特色治疗经验; (18) 老年痴呆症、顽固性失眠、血管性头痛的论治精神及特色疗法; (19) 名老中医临床经验总结; (20) 中医成才经验介绍; (21) 临床应用经方、成方、验方的体会; (22) 中医养生保健、药膳食疗方法介绍及理论研究; (23) 中医药教学经验介绍; (24) 中国医学史研究; (25) 中药、民族药研究及其现代应用; (26) 复方制剂的开发与研究。

### 2. 征文要求

(1) 论文要求论点明确、论据充分、结构严密、层次分明、文字精炼, 具有科学性、创新性、实用性; (2) 征文请附医院或主管单位介绍信; (3) 征文截止日期为 2013 年 5 月 10 日; (4) 每位作者只限投一篇论文(要求 2000 字以内); (5) 文稿中的计量单位均须采用法定计量单位; (6) 文题下署作者姓名, 作者单位名称、地址、邮政编码、电话请写在文稿末尾, 请在投稿信封左下角注明“会议”字样; (7) 论文尽量不用表格及图片; (8) 欢迎电子邮件投稿; (9) 征文经专家评审后, 录用文章将刊登在《世界中医药》杂志 2013 年增刊上(第一、第二作者分别授予国家 II 类继续教育学分 6、5 分), 并邀请参加会议。入选论文安排在大会交流, 参加会议者颁发证书并授予国家 II 类继续教育学分 10 分。

3. 投稿地址: 北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 302 室《世界中医药》杂志社; 邮编: 100101; 电话: (010) 58239055, 传真: (010) 58239066, 手机: 13901318403, E-mail: 113901318403@139.com, 联系人: 王炳岐

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net