

落新妇苷对人脐静脉内皮细胞迁移及管腔形成的影响

吴 灏¹, 吴欣帆², 梁宇强¹, 蓝昭杨¹, 赖玲芝² (茂名市人民医院 1. 急诊ICU; 2. 口腔科, 广东茂名 525000)

摘 要: **目的** 探讨落新妇苷在体外促进血管生成过程中的影响。**方法** 将体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中分别加入不同浓度(0、1、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)的落新妇苷,通过MTT检测HUVECs的增殖能力;划痕实验检测细胞迁移能力;基质胶小管形成实验检测细胞管腔形成能力;Western blot检测血管内皮生长因子A(VEGFA)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR-2)及血管性血友病因子(VWF)的蛋白表达情况。**结果** 将不同浓度落新妇苷处理HUVECs 6、12和24 h后,细胞的增殖数目与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$),而落新妇苷作用细胞48 h后,40 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞的增殖数与各组相比差异均有统计学意义($P<0.01$ 或0.001)。划痕实验显示10 $\mu\text{mol/L}$ 组6、12和24 h有大量的细胞向中间的划痕区域迁移,细胞分布广泛,较对照组显著增多($P<0.01$);24 h时,10 $\mu\text{mol/L}$ 组划痕愈合面明显多于1、20 $\mu\text{mol/L}$ 组($P<0.01$)。与对照组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 组形成的管腔样结构最多,各浓度落新妇苷处理组形成的节点数、主节段长度及网格数均显著增加($P<0.05$)。落新妇苷能显著增加VEGFA、VEGFR-2和VWF的蛋白表达,1、10 $\mu\text{mol/L}$ 组较对照组明显增高($P<0.01$)。**结论** 落新妇苷可促进HUVECs细胞迁移及管腔形成。

关键词: 落新妇苷;管腔形成;人脐静脉内皮细胞;迁移

中图分类号: R 285

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 04-0390-05

Effects of Astilbin on the migration and angiogenesis of vascular endothelial cells

WU Hao¹, WU Xing-fan², LIANG Yu-qiang¹, LAN Zhao-yang¹, LAI Ling-zhi² (Maoming People's Hospital 1. Emergency ICU; 2. Department of Stomatology, Maoming 525000, China)

Abstract: **Objective** The aim of this study is to investigate the effect of astilbin on angiogenesis in vitro. **Methods** Different concentrations (0, 1, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$) of astilbin were added into HUVECs cultured in vitro, and the proliferation ability of HUVECs was detected by using MTT. The ability of cell migration was detected by scratch test, and the ability of cell lumen formation was determined by using matrix glue tubule formation test. The expression of angiogenesis-related factors (VEGFA, VEGFR-2, and VWF) was detected by using Western blot. **Results** There was no significant difference in the number of HUVECs in astilbin treatment with different concentrations compared with the control group ($P>0.05$), while the number of cells in the 40 $\mu\text{mol/L}$ group was statistically different from that of the control group after 48 h ($P<0.01$ or 0.001). The Scratch test showed that a large number of cells migrated to the middle scratch area in the 10 $\mu\text{mol/L}$ group at 6, 12 and 24 h, with a wide distribution of cells, significantly increasing compared to the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The migration of HUVECs in the 10 $\mu\text{mol/L}$ group was significantly increased compared to the 1 $\mu\text{mol/L}$ group and the 20 $\mu\text{mol/L}$ group at 24 h ($P<0.05$). Compared with the control group, the most lumen-like structures were formed in the 10 $\mu\text{mol/L}$ group, and the number of nodes, main segment length and mesh number were significantly increased in the astilbin treatment groups at all concentrations ($P<0.05$). Astilbin could significantly increase the expression of angiogenic factors VEGFA, VEGFR-2 and VWF, which were significantly higher in 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$ groups than in the control group ($P<0.01$). **Conclusion** Astilbin can promote the migration and angiogenesis of HUVECs cells.

Key words: astilbin; angiogenesis; HUVECs; migration

血管生成是发育、繁殖和组织修复的重要过程。内皮细胞通过迁移、增殖、血管吻合和修剪等过程,参与现有血管网络的扩张,在血管生成中发挥至关重要的

作用。近年来,中医药因其天然的低毒性和广泛的药理活性,在促血管再生领域的应用备受关注^[1]。落新妇苷是一种具有生物活性的天然黄酮化合物,由落新

收稿日期: 2024-03-20

基金项目: 茂名市科技计划项目(2022125)

作者简介: 吴 灏,男,学士,主治医师, E-mail: 86818830@qq.com

妇属植物中提取,分子式为 $C_{21}H_{22}O_{11}$,为白色结晶性粉末,熔点为179~181℃,易溶于甲醇、乙醇,微溶于水^[2]。研究证实,落新妇苷具有改善心肌损伤、再灌注损伤等多种药理活性,对血管系统具有显著的保护作用^[3-4]。应军等^[5]研究落新妇苷对斑马鱼血管新生损伤、出血性中风、心脏损伤的保护作用,发现落新妇苷能够通过增加血管生长因子的表达,进而促进血管损伤模型中新生血管的生长。因此我们推测落新妇苷具有促进血管生成的作用,但其作用机制尚不明确。本研究通过探讨落新妇苷对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)迁移及管腔形成的影响,为落新妇苷在血管新生中的作用机制奠定研究基础,以期对骨缺损修复、骨组织工程研究以及缺血性疾病治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 HUVECs培养

HUVECs购自武汉procell公司。细胞复苏过程如下:将含有1 mL HUVECs细胞液的冻存管在37℃水浴中迅速摇晃解冻,加4 mL培养基混合均匀。1 000 r/min离心3 min,弃上清液,加1~2 mL培养基吹打混匀后,将细胞悬液加入含适量培养基的培养皿中,置于37℃、5% CO₂ 孵箱中培养过夜;次日内皮细胞贴壁完全后更换细胞培养液。当细胞密度达到约90%时,用0.25%含有乙二胺四乙酸(EDTA)的胰蛋白酶溶液(Gibco公司,美国)消化,传代备用。

1.2 MTT检测HUVECs增殖能力

将对数生长期HUVECs细胞以每孔 2×10^3 的密度接种于96孔培养板中,粘附24 h,分别用1、10、20及40 μmol/L落新妇苷对HUVECs进行药物处理,在5% CO₂、37℃培养箱中分别孵育6、12、24及48 h,每组6个重复,加入5 g/L MTT试剂充分混匀,继续培养4 h,每孔加入150 μL DMSO,将样品在摇床上振荡10 min。记录490 nm处的吸光度。

1.3 划痕实验检测HUVECs的迁移能力

接种细胞前,使用记号笔于12孔板底部划笔直均匀贯穿孔的直线,线与线之间的间隔为5 mm,取对数生长期、生长状态良好的HUVECs,以 2×10^5 /孔的密度接种于12孔板中,待各孔中的细胞生长至90%,200 μL枪头垂直于培养板面,在孔中做横直线划痕,PBS漂洗2~3次后按照分组加入相应的培养基。设置分组:完全培养基为对照组;1、10及20 μmol/L落新妇苷为实验组。每组设置3个孔,立即于倒置显微镜拍摄记为0 h,培养6、12及24 h后,分别于倒置显

镜下拍摄(与0 h相同的位置)。

1.4 体外成管实验检测HUVECs管腔形成能力

取生长状态良好的HUVECs接种于6孔板中,待细胞融合至70%~80%时,随机分为4组,培养基为对照组,1、10及20 μmol/L落新妇苷为实验组,于37℃ 5% CO₂ 孵箱中孵育24 h后,进行小管形成实验。步骤如下:将稀释的Matrigel基质胶(50 μL/cm²)吸入96孔板中,冰上操作,培养箱孵育30 min。将上述培养的细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于铺好基质胶的96孔板中,每孔加入50 μL基础培养基,每组设置3个副孔。12 h后于倒置显微镜拍摄,每组拍摄5个区域。Image J分析计算每孔内管状结构形成的总长度。

1.5 Western blot检测血管生成相关因子的蛋白表达情况

取生长状态良好,对数生长期的HUVECs接种于6孔板中,待细胞融合70%~80%后,按上面实验分组培养12 h,每组设置3个孔,放于孵箱培养;提取细胞总蛋白,配制SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,其中分离胶为10%,浓缩胶为5%,电泳结束后,用电转法将蛋白转移至PVDF膜上。转膜完成后用5%脱脂奶粉液在室内条件下封闭PVDF膜1 h,而后依次与内参GAPDH、血管内皮生长因子A(VEGFA)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR-2)及血管性血友病因子(VWF)抗体(1:500稀释)4℃冰箱条件下孵育过夜。二抗(1:3 000稀释)与PVDF膜在室温条件下孵育1 h。然后在PVDF膜上滴加200 μL实验配制的发光液,显影后采用Image J图像分析软件分析条带的灰度值。

1.6 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用One-way ANOVA分析及 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 落新妇苷对HUVECs增殖能力的影响

将不同浓度落新妇苷处理HUVECs 6、12和24 h后,细胞的增殖数目与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。落新妇苷作用细胞48 h后,40 μmol/L组细胞增殖数与各组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或0.001),提示高浓度落新妇苷对细胞活性具有毒性效应。而1、10、20 μmol/L落新妇苷对HUVECs的增殖能力无影响。因此,后续实验选择以上3个浓度进行成管活性检测。见图1。

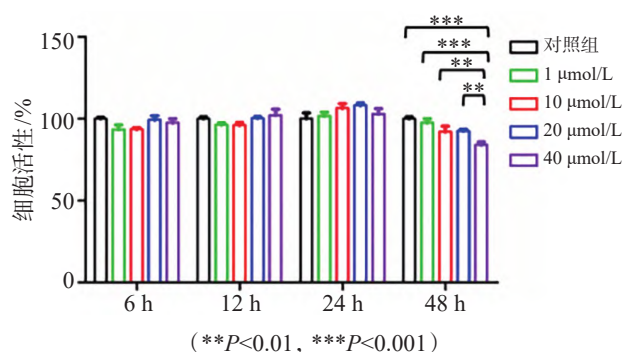


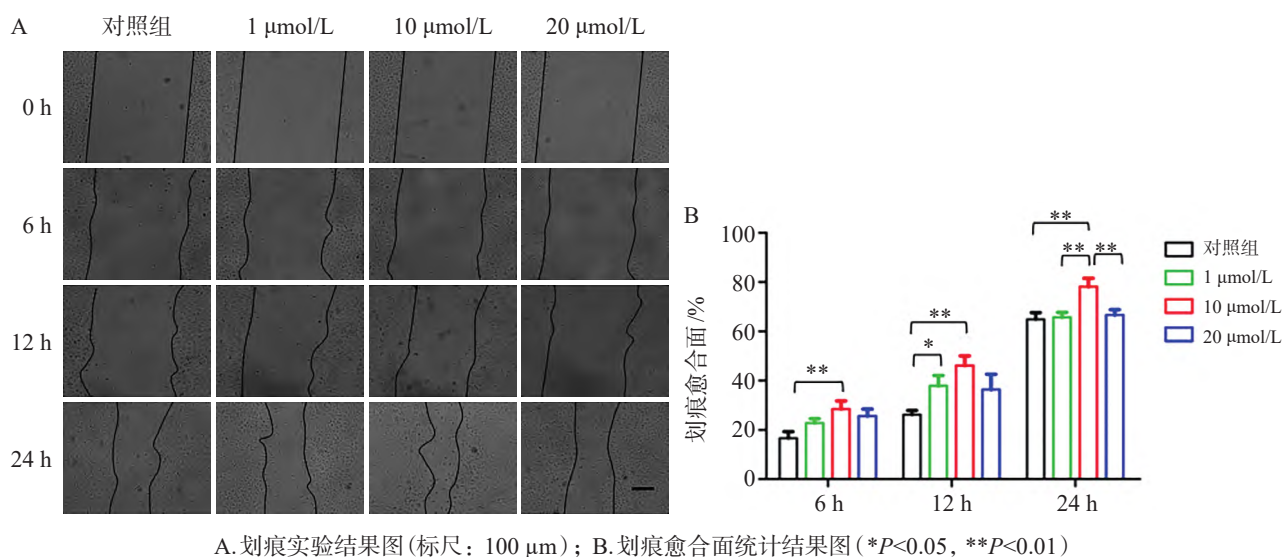
图1 落新妇苷对 HUVECs 细胞增殖能力的影响

2.2 落新妇苷对 HUVECs 迁移能力的影响

不同浓度落新妇苷刺激培养 HUVECs 6、12 和 24 h 后,结果如图 2A、B 可见, 10 μmol/L 组 6、12 和 24 h 有大量的细胞向中间的划痕区域迁移,细胞分布广泛,较对照组显著增多 ($P<0.01$)。24 h 时 10 μmol/L 组划痕愈合面明显多于 1、20 μmol/L 组 ($P<0.01$)。

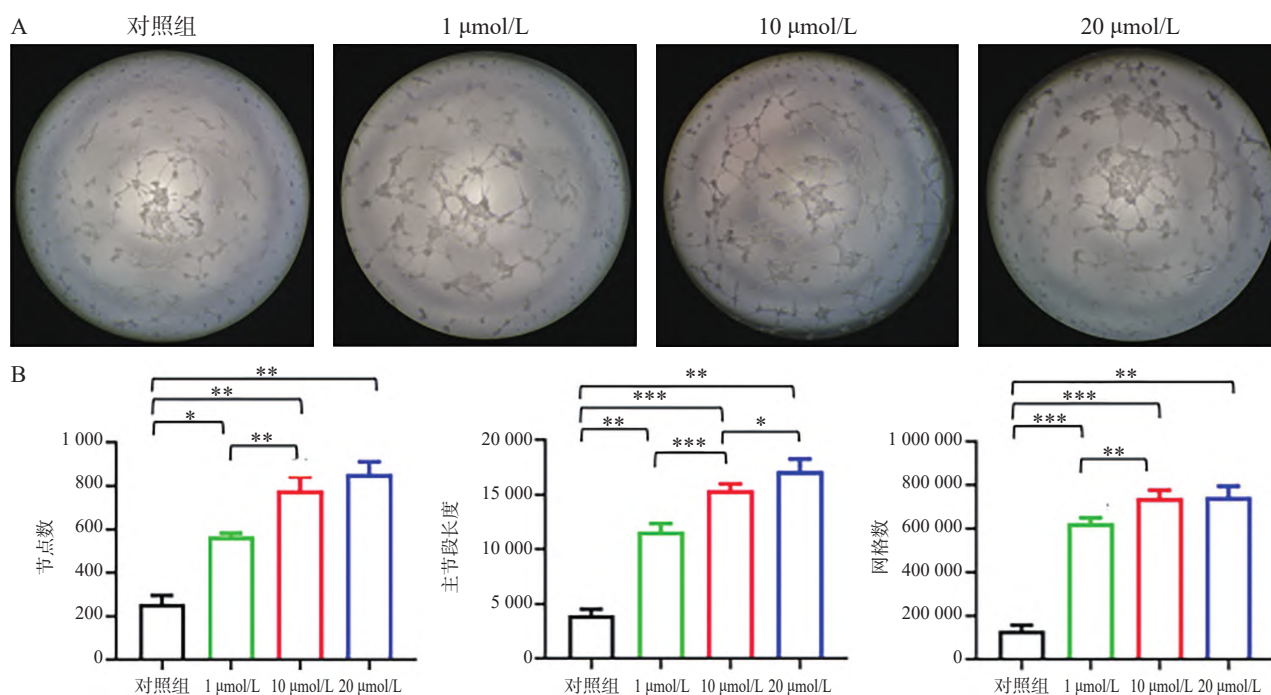
2.3 落新妇苷对 HUVECs 管腔形成能力的影响

不同浓度落新妇苷刺激培养 HUVECs 12 h 后,结果如图 3A、B 可见, HUVECs 在基质胶上逐渐伸展,



A. 划痕实验结果图 (标尺: 100 μm); B. 划痕愈合面统计结果图 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

图2 落新妇苷对 HUVECs 细胞迁移能力的影响



A. 对照组及不同浓度落新妇苷处理 HUVECs 12 h 的成管实验; B. 对主段长度、节点数和网格数量进行定量分析 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

图3 落新妇苷对 HUVECs 血管生成能力的影响

连接成型,形成管腔样结构,其中对照组形成的管腔样结构最少,10 $\mu\text{mol/L}$ 组形成的管腔样结构最多。与对照组比较,各浓度落新妇苷处理组形成的节点数、主节段长度及网格数均显著增加($P<0.05$)。

2.4 落新妇苷对 HUVECs 血管生成相关因子蛋白表达的影响

与对照组相比,落新妇苷能够显著提升 VEGFA 和 VEGFR-2 蛋白的表达($P<0.001$); VWF 蛋白表达在 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 组较对照组亦明显增高($P<0.001$),见图 4A、B。

3 讨论

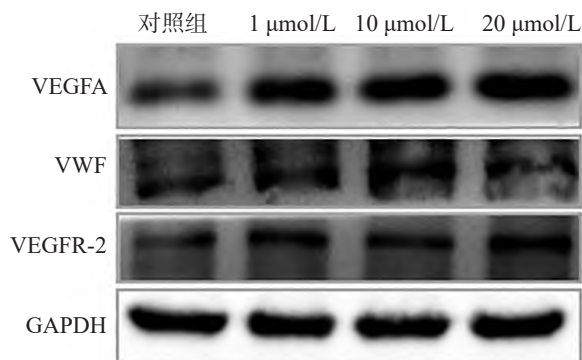
研究发现,许多草药或草药化合物具有“滋养”血液的能力,它们在一定程度上能够促进内皮细胞血管的生成^[6]。落新妇苷是一种黄酮类化合物,存在于多种植物和食物中,具有多种生物活性,如保护缺血再灌注、调节脂肪代谢、抑制炎症和抑制角质细胞增殖等^[7-9],且对血管系统具有显著的保护作用。

本研究结果发现,1、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 落新妇苷处理 HUVECs 6、12 和 24 h 后,MTT 检测细胞的增殖数目与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$),证明该浓度落新妇苷对细胞无毒性,并对细胞的增殖无影响;48 h 后 40 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比差异有统计学意义($P<0.001$),考虑原因可能是落新妇苷药物浓度过高,作用时间过长导致血管内皮细胞周期缩短,促进其凋亡,从而造成抑制细胞增殖的结果,因此后续实验选择 1、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 落新妇苷进行成管活性检测。细胞划痕实验是检测细胞迁移运动的经典实验,内皮细胞迁移能力越强,预示着血管生成越旺盛。本研究发现,不同浓度落新妇苷刺激培养 HUVECs 后,10 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞迁移能力最强,在 24 h 后划痕大面积覆盖,与其他组相比,差异有统计学意义($P<0.01$),

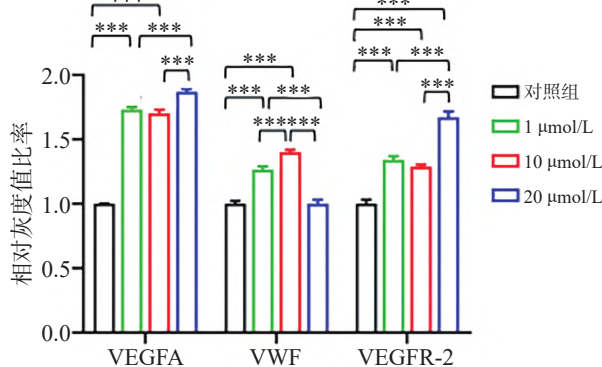
提示适当浓度的落新妇苷及作用时间能够激活血管生成的信号通路,促进血管的生成。管腔形成实验是体外研究血管发生的经典方法。本研究发现,不同浓度落新妇苷均可形成明显的管腔样结构,其中 10 $\mu\text{mol/L}$ 组形成的管腔样结构最多,原因可能与落新妇苷激活血管生成的信号通路,在血管生成过程中发挥积极作用有关。

血管生成是涉及多种细胞、多种分子的复杂过程。VEGFA 是血管生成的分子中枢,是血管生成最重要的调节因子之一^[10-13]。血管生成中最关键的信号通路是 VEGFA/VEGFR-2。当 VEGFA 与其受体 VEGFR-2 结合时,可以促进细胞增殖、迁移和管腔形成^[14]。同时, VWF 也被认为是血管生成的标志和调节因子^[15],而负责 VWF 降解的血管性血友病因子裂解酶 13 已被证明具有促血管生成的作用^[16-17]。本研究结果发现,所有组落新妇苷能够显著提升 VEGFA、VEGFR-2、VWF 的表达,提示落新妇苷在体外可促进 HUVECs 血管生成能力,这与细胞划痕实验,管腔形成实验一致,而 20 $\mu\text{mol/L}$ 组的 VEGFA、VEGFR-2 表达最高,与细胞划痕实验的迁移能力最佳浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 组不一致。我们推测低浓度落新妇苷虽然可以刺激 VEGFA 等因子的表达,但在促进迁移能力方面尚未达到浓度的阈值,同理,高浓度虽然能促进相关因子的表达,但有可能浓度过高,不利于细胞的迁移。内皮细胞成血管的能力与迁移能力、成管相关蛋白表达都有关系,但是不一定是对等。迁移只是一个方面,迁移能促进血管生成,但血管生成能力的影响因素不仅仅是细胞迁移能力。而管腔形成实验可模拟血管早期发生过程,是体外检查内皮细胞功能最完整的指标。因此最终浓度的选择参考以管腔形成实验为准,最佳药物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

A



B



A. Western blot 检测成管相关差异蛋白表达; B. 成管相关差异蛋白表达灰度值 (***) $P<0.001$

图 4 落新妇苷对 HUVECs 成管相关蛋白表达水平的影响

综上所述,本研究使用不同浓度的落新妇苷处理 HUVECs, MTT 检测发现 1、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 落新妇苷对细胞无毒性,对细胞的增殖无影响。其次通过研究细胞迁移、小管形成及血管生成相关因子表达,证明落新妇苷是促进血管内皮细胞血管生成的药物,具有重要的临床药物价值,其最佳药物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。本研究不足之处在于,仅在体外细胞进行了研究,缺乏体内组织水平的验证,因此后期将进一步深入研究落新妇苷调控血管生成的分子机制,以期药物的应用提供新的思路。

参考文献:

- [1] WU C, CHEN F, HUANG S, et al. Progress on the role of traditional Chinese medicine in therapeutic angiogenesis of heart failure[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301: 115770.
- [2] HUANG H, CHENG Z, SHI H, et al. Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of *Engelhardia roxburghiana* and their potential anti-inflammatory properties[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(9): 4562-4569.
- [3] DIAO H, KANG Z, HAN F, et al. Astilbin protects diabetic rat heart against ischemia-reperfusion injury via blockade of HMGB1-dependent NF- κ B signaling pathway[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 63(10): 4-10.
- [4] 宋少华, 沈筱芸, 刘芳, 等. 落新妇苷对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中西医结合学报*, 2009, 7(8): 753-757.
- [5] 应军, 李晶晶, 黎响, 等. 落新妇苷对斑马鱼心脑血管疾病模型的作用研究[J]. *广东药学院学报*, 2014, 30(4): 472-474.
- [6] BAO J, SHI Y, TAO M, et al. Pharmacological inhibition of autophagy by 3-MA attenuates hyperuricemic nephropathy[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(21): 2299-2322.
- [7] SHARMA A, GUPTA S, CHAUHAN S, et al. Astilbin: A promising unexplored compound with multidimensional medicinal and health benefits[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158(10): 48-94.
- [8] YANG D, ZHANG Q F. The natural source, physicochemical properties, biological activities and metabolism of Astilbin[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2023, 63(28): 9506-9518.
- [9] HAN X, SUN J, NIU T, et al. Molecular insight into the binding of Astilbin with human serum albumin and its effect on antioxidant characteristics of Astilbin[J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4487.
- [10] HAN M, SUN H, ZHOU Q, et al. Effects of RNA methylation on Tumor angiogenesis and cancer progression[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 198.
- [11] JIN E, CHAE D S, SON M, et al. Angiogenic characteristics of human stromal vascular fraction in ischemic hindlimb[J]. *Int J Cardiol*, 2017, 234: 38-47.
- [12] APTE R S, CHEN D S, FERRARA N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development[J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248-1264.
- [13] 陈旭斌, 陈坤, 周昊, 等. 肿瘤转移相关因子 1 和血管内皮因子在口腔鳞癌组织中的表达及其与肿瘤侵袭、转移的相关性[J]. *广东医科大学学报*, 2021, 39(1): 26-30.
- [14] TEMESGEN T G, TESHOME B, NJOGU P. Treatment outcomes and associated factors among hospitalized stroke patients at shashemene referral hospital, ethiopia[J]. *Stroke Res Treat*, 2018, 2018: 8079578.
- [15] STARKE R D, FERRARO F, PASCHALAKI K E, et al. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis[J]. *Blood*, 2011, 117(3): 1071-1080.
- [16] XU H, CAO Y, YANG X, et al. ADAMTS13 controls vascular remodeling by modifying VWF reactivity during stroke recovery[J]. *Blood*, 2017, 130(1): 11-22.
- [17] LI G, RYABY J T, CARNEY D H, et al. Bone formation is enhanced by thrombin-related peptide Tp508 during distraction osteogenesis[J]. *J Orthop Res*, 2005, 23(1): 196-202.

(责任编辑: 李 晓)