

· 基础研究 ·

直流电场对血管内皮细胞排列的影响及肌动蛋白在其中的作用

王恩彤 陈伟 龚维熙 马晓莉

【摘要】目的 研究外源性直流电场对血管内皮细胞(VEC)排列行为的作用及细胞骨架肌动蛋白的功能抑制对直流电场作用的影响。**方法** 取 VEC, 分为对照组、细胞松弛素 B 组和 Y27632 组, 后两组分别接受肌动蛋白抑制剂细胞松弛素 B 和 Y27632 处理, 3 组细胞均暴露于场强为 200 mV/mm 的直流电场中, 用图像分析系统分别记录暴露于直流电场前及暴露 4 h 和 8 h 的细胞图像。对细胞排列方向性进行定量分析, 采用免疫荧光染色及共聚焦显微镜观察细胞骨架肌动蛋白微丝的变化。**结果** 对照组细胞电场暴露前呈随机极向排列, 而暴露于直流电场的细胞则呈一定极向定向排列, 即细胞长轴与直流电场矢量方向垂直。细胞松弛素 B 和 Y27632 可抑制细胞的肌动蛋白微丝张力纤维形成, 但均未减弱细胞在直流电场中的定向排列现象, 且经 Y27632 处理的细胞在直流电场中的定向排列现象出现得更早。电场暴露前对照组细胞的肌动蛋白微丝骨架张力纤维亦呈随机极向排列, 而暴露于直流电场中的细胞的肌动蛋白微丝及其张力纤维的排列方向则多与电场矢量方向相垂直。**结论** 直流电场可诱使 VEC 定向排列, 但其作用不依赖于细胞骨架肌动蛋白微丝的聚合功能及张力纤维的形成。

【关键词】 电刺激; 血管内皮细胞; 细胞极向; 细胞骨架; 肌动蛋白

Effects of direct current electric fields on vascular endothelial cell orientation and the influence of actin

WANG En-tong, CHEN Wei, GONG Wei-xi, MA Xiao-li. Department of Otolaryngology, Head & Neck Surgery, Air Force General Hospital, Beijing 100142, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of direct current electric fields on the orientation responses of vascular endothelial cells and the influence of the cytoskeleton filament actin on the orientation responses of cells in direct current electric fields. **Methods** Cultured vascular endothelial cells, with or without treatment with the actin inhibitors cytochalasin B or Y27632, were exposed to a direct current electric field of 200 mV/mm, and cell images were taken at 0, 4 and 8 hours during the exposure. Cells not exposed to the electric field were used as a control. Cell orientation was quantified using an image analyzer. Immunofluorescence staining of the cells for F-actin was observed through confocal microscopy. **Results** Cells in the control cultures oriented randomly with no predominant polarity. Cells exposed to the direct current electric field showed significant re-orientation to align their long axes perpendicular to the field vector. Neither cytochalasin B nor Y27632 reduced the re-orientation induced by the field, and earlier orientation response was observed in Y27632-treated cells. F-actin staining showed that the orientation of F-actin stress fibres was at random in control cells and perpendicular to the field vector in the field-exposed cells without any drug treatment. Although the formation of stress fibres was inhibited in the cytochalasin B-or Y27632-treated cells, the cells in the direct current electric fields kept their re-orientation responses, similar to the cells without any drug treatment. **Conclusions** A direct current electric field can induce vascular endothelial cells to re-orient, but the re-orientation response is independent of actin polymerization and actin stress fiber formation.

【Key words】 Electric stimulation; Vascular endothelial cells; Cell polarity; Cytoskeleton; Actin

血管发生(angiogenesis),即新生血管的形成,参与机体许多生理或病理过程,不仅为胚胎发育、创伤修复、组织再生等所必需,亦参与许多血管发生相关性疾病,更是肿瘤生长、侵袭和转移的基础,抑制肿瘤血管

发生已成为治疗肿瘤的一个重要手段,血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC)也已成为肿瘤治疗的另一靶细胞^[1-5]。

内源性直流电场广泛存在于活体组织器官中,对组织细胞的功能活动具有重要的影响;外源性直流电场对细胞的增殖、迁移、排列等活动亦有明显的影响^[6-8]。VEC的增殖、迁移及有序排列是血管发生过程中的关键活动^[9],并受外源性直流电场的影响^[6,8,10-12]。细胞微丝骨架对维持细胞形态以及在细

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.06.001

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871268),北京市自然科学基金资助项目(3102029)

作者单位:100142 北京,空军总医院耳鼻咽喉头颈外科

胞迁移、排列等活动中均具有重要作用,直流电场诱导的细胞排列反应亦与其功能有关^[13]。本研究观察了直流电场对 VEC 定向排列的作用,以及细胞微丝骨架肌动蛋白对细胞在直流电场中定向排列反应的影响,报道如下。

材料与方法

一、细胞培养及分组

VEC 为源自胎儿脐静脉的 VEC 株,购自美国组织细胞库。细胞培养基采用 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM),其中含有 12.5% 胎牛血清、0.04 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、2.5 μg/ml 制霉菌素,均为 Gibco BRL 公司产品。VEC 在条件为 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,所有试验均采用同一代细胞。每次实验前 24 h,将冻存的细胞复苏,然后以 10⁵ 个/ml 的密度接种于预制的细胞培养槽中,该培养槽由 2 片平行放置且相距 10 mm 的盖玻片条(厚 0.3 mm、长 22 mm)通过硅酮胶(美国 Dow Corning 公司产品)固定于大小 100 mm × 20 mm 组织培养皿的底面制成^[6,8,14],见图 1。

将细胞分为细胞松弛素 B 组、Y27632 组和不接受药物处理的对照组,3 组细胞均暴露于直流电场。

二、直流电场暴露

细胞培养 24 h 后更换培养基,细胞培养槽以大小 22 mm × 22 mm 的盖玻片借硅酮胶粘贴覆盖,形成一个两端开放的细胞培养小室,维度为 22 mm × 10 mm × 0.3 mm。应用 Leica 公司产 Q500MC 型图像分析系统记录直流电场暴露前(0 h)的细胞图像后,随即用直流电场暴露装置^[6,8,14]将细胞暴露于场强为 200 mV/mm 的直流电场中(图 1),暴露时间为 8 h。

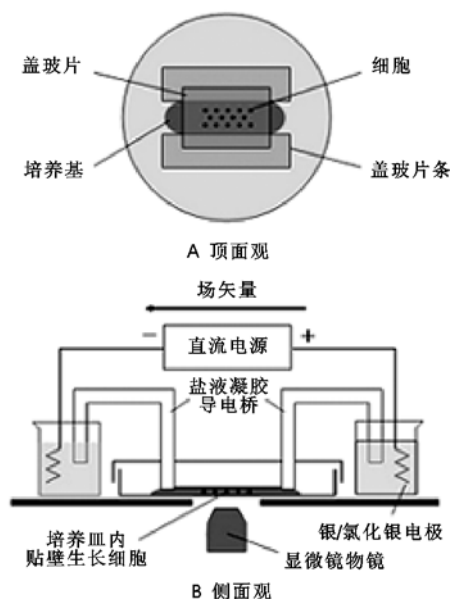


图 1 细胞培养与直流电场暴露装置示意图

三、肌动蛋白抑制剂的应用

记录直流电场暴露前(0 h)的细胞图像后,将细胞松弛素 B 组和 Y27632 组的培养基分别更换为含肌动蛋白抑制剂——细胞松弛素 B (cytochalasin B, 5 μmol/L, 美国 Sigma 公司)和 Y27632 (20 μmol/L, 日本 Yoshitomi 制药公司提供)的 DMEM,对照组的培养基则更换为不含上述药物的 DMEM;然后将 3 组细胞置于条件为 37 ℃、5% CO₂ 的孵箱中,暴露于直流电场中。在直流电场中暴露 4 h 后记录细胞图像,然后用 DMEM 漂洗细胞,以洗脱培养基中的细胞松弛素 B 或 Y27632,继续将细胞暴露于直流电场中至 8 h。

四、细胞排列方向的定量分析

用图像分析仪记录同一视野下,在直流电场暴露前(0 h)及暴露 4 h 和 8 h 的系列细胞图像。细胞排列方向的定量分析采用下述方法:将细胞排列方向定义为水平场矢量(即细胞培养小室长轴方向)的函数 $\cos 2\theta$,其中 θ 为细胞长轴与水平场矢量垂线之间的夹角。通过图像分析仪测量每一细胞的 θ 角,细胞的极向值介于 -1 和 +1 之间;当细胞长轴与场矢量完全平行时,细胞的极向值为 -1;而当细胞长轴与场矢量完全垂直时,则细胞的极向值为 +1。计算若干个细胞的平均极向值。一群随机取向排列的细胞平均极向值 ($\sum n \cos 2\theta / n$) 接近于 0^[11]。

五、荧光染色及共聚焦显微镜观察

于直流电场暴露后 4 h 和 8 h,用磷酸盐缓冲液在室温下快速漂洗细胞,4% 甲醛溶液固定 10 min,0.1% 三硝基甲苯溶液透化 3 min,以稀释度为 1:50 的罗丹明 (rhodamine) 鬼笔环肽 (phalloidin, 美国 Molecular Probes 公司)进行细胞微丝骨架 F-肌动蛋白免疫荧光染色,用美国 Bio-Rad 公司产 MRC-1240 型共聚焦显微镜观察其细胞微丝骨架的排列。

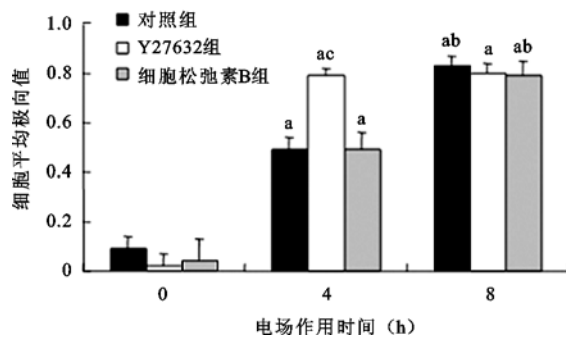
六、统计学分析

每个实验组的数据分别来自 3 次独立的实验,细胞极向值以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,各组均数间比较采用非配对 t 检验。

结 果

一、细胞在直流电场中的定向排列

对照组细胞在电场暴露前(0 h)的排列方向呈随机取向,细胞平均极向值为 (0.09 ± 0.05) ($n = 137$);而暴露于直流电场一定时间后,细胞则以一定的极向排列,即细胞长轴趋于与场矢量方向相垂直,细胞在直流电场中的这种定向排列呈一定时间依赖性,即随着暴露时间的增加其极向值增大,在直流电场中暴露 4 h 和 8 h 的细胞平均极向值分别为 (0.49 ± 0.05) ($n = 115$) 和 (0.83 ± 0.03) ($n = 90$),见图 2 和图 3。



注:与同组 0 h 相比,^a $P < 0.01$;与同组 4 h 相比,^b $P < 0.01$;与组间相应时间点比较,^c $P < 0.01$

图 2 各组暴露直流电场不同时间点细胞平均极向值的比较

二、肌动蛋白抑制剂对直流电场诱发的细胞定向排列的影响

细胞松弛素 B 组细胞暴露于直流电场 4 h 后,表现出与对照组在直流电场中相近的排列现象,细胞平均极向值分别为 (0.49 ± 0.07) ($n = 172$) 和 (0.49 ± 0.05) ($n = 115$);而与对照组和细胞松弛素 B 组相比,Y27632 组细胞在直流电场中的定向排列现象更为明显,细胞平均极向值明显增大,为 (0.79 ± 0.03) ($n = 121$, $P < 0.01$),见图 2。尽管细胞松弛素 B 或 Y27632 对细胞形态均具有明显的影响,但二者并不减弱细胞在直流电场中的定向排列现象,且 Y27632 组细胞在直流电场中的定向排列现象反而有所增强,见图 3。

细胞松弛素 B 组和 Y27632 组细胞暴露于直流电场 4 h 后,将培养基中的细胞松弛素 B 或 Y27632 洗脱并将细胞继续暴露于直流电场至 8 h,此时细胞形态均已恢复正常,仍呈现明显的定向排列反应,2 组细胞的平均极向值分别为 (0.79 ± 0.04) ($n = 150$) 和 (0.80 ± 0.03) ($n = 139$),均接近于对照组细胞的平均极向值。经细胞松弛素 B 处理的细胞在直流电场暴露 8 h 的平

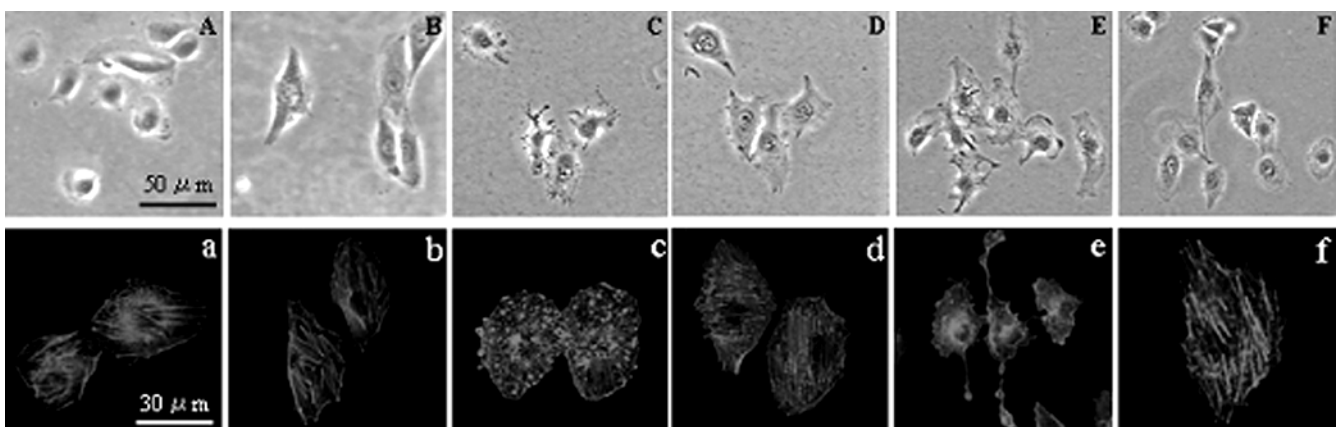
均极向值较其暴露 4 h 的平均极向值进一步增大($P < 0.01$);而经 Y27632 处理的细胞在直流电场暴露 8 h 的平均极向值与其暴露 4 h 的平均极向值相近,无进一步增大(图 2 和 3)。

三、细胞微丝骨架荧光染色及共聚焦显微镜观察

F-肌动蛋白免疫荧光染色及共聚焦显微镜观察结果显示,对照组细胞在直流电场暴露前,细胞微丝骨架张力纤维呈随机方向排列(图 3a 和 A)。对照组细胞暴露于直流电场后,与其在直流电场中以细胞长轴垂直于场矢量的排列方向(图 3B)相一致,细胞微丝骨架张力纤维则趋于与场矢量方向相垂直的方向排列(图 3b)。与对照组细胞相比较,在直流电场暴露 4 h,细胞松弛素 B 组细胞张力纤维以细胞为中心呈放射状排列,肌动蛋白小结增加(图 3c),而 Y27632 组细胞几乎见不到张力纤维的形成(图 3e),但这 2 组细胞在直流电场中的定向排列行为并未受到明显影响(图 3C 和 E)。细胞松弛素 B 组和 Y27632 组细胞培养基中细胞松弛素 B 或 Y27632 被洗脱后继续暴露于直流电场 4 h 后,细胞形态恢复正常且仍保持其在直流电场中的定向排列(图 3D 和 F),其细胞微丝骨架的排列形式亦得到恢复,但细胞松弛素 B 组细胞的微丝骨架张力纤维排列方向并非一致地垂直于场矢量(图 3d),而 Y27632 组的细胞微丝骨架张力纤维的排列方向则趋于与场矢量方向相垂直(图 3f)。

讨 论

近年来,血管发生研究领域迅速发展^[4],已发现多达 70 余种疾病的发生与血管发生异常有关而被称之为血管发生相关性疾病,其中肿瘤与之关系最为密切。一些影响血管发生的药物已被用于临床来治疗一些血管发生相关性疾病,一些血管发生抑制剂已被



注:场强 = 200 mV/mm,场矢量由右至左呈水平方向。A~F 为相差显微镜下图像;a~f 为细胞微丝骨架 F-肌动蛋白免疫荧光染色及共聚焦显微镜观察图像。A 与 a:对照组直流电场暴露前;B 与 b:对照组直流电场暴露 8 h;C 与 c:细胞松弛素 B 组直流电场暴露 4 h;D 与 d:细胞松弛素 B 组直流电场暴露 8 h;E 与 e:Y27632 组直流电场暴露 4 h;F 与 f:Y27632 组直流电场暴露 8 h

图 3 VEC 在直流电场中的定向排列及细胞松弛素 B 和 Y27632 对其影响

用于肿瘤的临床治疗并收到了明显的效果。如有研究者将血管发生抑制剂塞来昔布 (celecoxib) 用于一些经手术、放疗、化疗均难以控制的脑瘤患儿后,使其生存期明显延长^[2]。抑制肿瘤的血管发生已成为治疗肿瘤的一个重要手段,被认为是继手术、放疗和化疗之后第 4 种肿瘤治疗模式^[1-5]。

内源性直流电场广泛存在于活体组织器官中并对机体功能、活动具有重要的影响^[6-8]。研究发现,血管内皮存在多种生理性电位,如血液在血管内流动时可使管壁内皮细胞表面产生所谓的 ξ 电位,由此可诱导相应的内源性直流电场,其强度约为 $100 \sim 400 \text{ mV/mm}$ ^[11],但其生理学与病理学意义目前尚不十分清楚。外源性直流电场对一些组织细胞活动亦有明显的影响,许多细胞在外源性直流电场中发生定向迁移,并可改变形状和排列^[6,8,15]。VEC 的增殖、迁移以及在血管内壁的有序排列则是血管发生过程中的关键活动^[9],亦受到外源性直流电场的影响^[10-12]。本研究显示,VEC 在直流电场中发生重新定向排列,即其长轴趋于与场矢量的方向相垂直,提示血管发生过程中的 VEC 排列行为可能受到内源性直流电场的调节,而外源性直流电场则有可能成为影响、干预血管发生行为的一种调节因素。

细胞微丝骨架对维持细胞形态以及在细胞迁移、排列等活动中均具有重要的作用。直流电场所诱导的细胞排列反应亦与细胞微丝骨架的功能有关^[13]。本研究通过细胞微丝骨架 F-肌动蛋白免疫荧光染色及共聚焦显微镜观察显示,除了 VEC 在直流电场中呈现定向排列,其细胞微丝骨架的排列也发生了相应的改变,即趋于与场矢量方向相垂直。

细胞松弛素 B 可通过抑制细胞微丝骨架肌动蛋白的聚合反应而影响其功能^[16]。但本研究结果发现,尽管 VEC 经细胞松弛素 B 处理后其微丝骨架张力纤维的排列发生改变,呈以细胞为中心放射状排列,且肌动蛋白小结增加,但细胞在直流电场中的定向排列反应并未受到细胞松弛素 B 的影响,提示直流电场所诱导的 VEC 定向排列反应并非由肌动蛋白的聚合反应所介导。

Rho 家族蛋白参与细胞微丝骨架肌动蛋白的重组,Rho 对其局部黏附性和张力纤维的形成具有调节作用,Rho 相关丝氨酸/苏氨酸激酶家族蛋白 p160-ROCK 和 ROK/Rho 激酶/ROCK-II 为 Rho 的效应子,可诱导成纤维细胞和上皮细胞的局部黏附性增加,促进张力纤维形成。Y27632 为 ROCK/ROK 蛋白激酶家族的特异性抑制剂,可抑制 p160-ROCK 所诱发的细胞张力纤维形成及细胞局部黏附性增加^[17-18]。本研究显示,暴露于直流电场 4 h 后,经 Y27632 处理的细胞几乎见不到张力纤维的形成,但细胞在直流电场中的定向排列反应并未受到 Y27632 的抑制,反而较未经药物处理的对照细胞更为

明显,在电场中的定向排列反应提早出现。这可能与细胞的局部黏附性受到抑制从而使之在直流电场中更易完成其定向排列反应有关,并提示该反应并不依赖于细胞微丝骨架张力纤维的形成。

参 考 文 献

- [1] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 2005, 438:932-936.
- [2] Kieran MW, Turner CD, Rubin JB, et al. A feasibility trial of antiangiogenic (metronomic) chemotherapy in pediatric patients with recurrent or progressive cancer. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2005, 27:573-581.
- [3] Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Disc*, 2007, 6:273-286.
- [4] Folkman J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *J Pediatr Surg*, 2007, 42:1-11.
- [5] Rafii S, Lyden D. A few to flip the angiogenic switch. *Science*, 2008, 319:163-164.
- [6] McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, et al. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. *Physiol Rev*, 2005, 85:943-978.
- [7] Zhao M, Song B, Pu J, et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature*, 2006, 442:457-460.
- [8] 赵敏, 王恩彤. 生物电信号与组织再生//付小兵, 王正国, 吴祖泽. 再生医学原理与实践. 上海: 上海科学技术出版社, 2008:891-924.
- [9] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997, 386:671-674.
- [10] Wang E, Yin Y, Zhao M, et al. Physiological electric fields control the G1/S phase cell cycle checkpoint to inhibit endothelial cell proliferation. *FASEB J*, 2003, 17:458-460.
- [11] Zhao M, Bai H, Wang E, et al. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J Cell Sci*, 2004, 117:397-405.
- [12] Bai H, McCaig CD, Forrester JV, et al. DC electric fields induce distinct preangiogenic responses in microvascular and macrovascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24:1234-1239.
- [13] Rajnicek AM, Foubister LE, McCaig CD. Alignment of corneal and lens epithelial cells by co-operative effects of substratum topography and DC electric fields. *Biomaterials*, 2008, 29:2082-2295.
- [14] Song B, Gu Y, Pu J, et al. Application of direct current electric fields to cells and tissues in vitro and modulation of wound electric field in vivo. *Nat Protoc*, 2007, 2:1479-1489.
- [15] Wang E, Zhao M, Forrester JV, et al. Re-orientation and faster, directed migration of lens epithelial cells in a physiological electric field. *Exp Eye Res*, 2000, 71:91-98.
- [16] Lovelady DC, Friedman J, Patel S, et al. Detecting effects of low levels of cytochalasin B in 3T3 fibroblast cultures by analysis of electrical noise obtained from cellular micromotion. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24:2250-2254.
- [17] Amano M, Chihara K, Kimura K, et al. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science*, 1997, 275:1308-1311.
- [18] Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated kinase in hypertension. *Nature*, 1997, 389:990-994.

(修回日期:2009-09-25)

(本文编辑:吴 倩)