

· 基础研究 ·

整合素 $\beta 1$ 反义寡核苷酸对次声诱导 ECV-304 细胞 F-actin 表达的影响

王冰水 陈景藻 郭国祯 王斌 袁华 刘静 陈丹

【摘要】目的 研究整合素 $\beta 1$ 反义寡核苷酸 (ASODN) 对次声诱导人脐血管内皮细胞 (ECV-304) 骨架微丝 F-actin 表达的影响, 探讨次声信号向细胞内传导的途径。**方法** 应用脂质体转染试剂介导整合素 $\beta 1$ 正义寡核苷酸 (SODN) 和 ASODN 转染 ECV-304, 并将细胞分为次声假暴露组、次声假暴露 + ASODN 组 (转染整合素 $\beta 1$ 反义寡核苷酸片断)、次声假暴露 + SODN 组 (转染整合素 $\beta 1$ 正义寡核苷酸片断)、次声暴露组、次声暴露 + ASODN 组和次声暴露 + SODN 组。次声作用频率为 16 Hz, 声压输出为 130 dB, 时间 2 h。应用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞骨架微丝聚合态肌动蛋白 (F-actin) 的改变, 测定单个细胞 F-actin 的平均荧光强度。**结果** 次声假暴露组、次声假暴露 + ASODN 组和次声假暴露 + SODN 组的 ECV-304 细胞胞浆内有少量肌动蛋白纤维丝, 方向性较差, 大部分荧光物质呈弥漫状态, 这 3 组 F-actin 表达差异无统计学意义。在接受次声暴露的 3 组细胞中, 次声暴露组的 F-actin 表达明显增强, 大多为较长的粗大应力丝, 沿细胞纵轴排列较多, 数量及荧光强度明显增加; 与之相比, 次声暴露 + ASODN 组的细胞内 F-actin 荧光强度明显较弱; 而次声暴露 + SODN 组的细胞 F-actin 表达与次声暴露组差异无统计学意义。**结论** 次声作用可引起 ECV-304 细胞中细胞骨架 F-actin 表达增加, 转染整合素 $\beta 1$ ASODN 可部分抑制次声引起的 F-actin 表达; 次声信号向细胞内传导可能与整合素-细胞骨架这一通路有关。

【关键词】 整合素; 寡核苷酸; 次声; 人脐静脉血管内皮细胞; 聚合态肌动蛋白

The effects of integrin $\beta 1$ antisense oligodeoxynucleotide on the expression of F-actin in ECV-304 cells exposed to infrasound WANG Bing-shui, CHEN Jing-zao, GUO Guo-zheng, WANG Bin, YUAN Hua, LIU Jing, CHEN Dan. Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】Objective To study the effect of integrin $\beta 1$ antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) on the expression of F-actin in ECV-304 cells exposed to infrasound, and to explore the pathway of infrasound signal transfer into the cells. **Methods** integrin $\beta 1$ oligodeoxynucleotides were embedded in cationic liposome lipofectamine 2000 reagent and transfected into ECV-304 cells. Laser scanning confocal microscopy was used to observe F-actin's expression when the cells were exposed to 16 Hz infrasound at 130 dB for 2 h. The cells' average fluorescence was examined using spectrofluorimetric quantification after immunofluorescent staining. **Results** Among the three false exposure groups, most fluorescein-labelled substances in the cells were in a diffuse state. There were few actin filaments, and they were tenuous and short, without direction. The cells' fluorescence intensities were almost the same. In a group exposed to infrasound, F-actin was thick and long with a longitudinal arrangement. Fluorescence intensities were strong. However, less F-actin expression was observed in the cells of the ASODN group exposed to infrasound compared with the others similarly exposed. Correspondingly, F-actin expression in the ASODN group exposed to infrasound was almost the same as in the other exposed group. **Conclusion** F-actin expression can be increased in ECV-304 cells by infrasound exposure, but integrin $\beta 1$ ASODN may partially inhibit its expression. The extracellular matrix-integrin-cytoskeleton may be one of the transduction pathways for infrasound signals into the cells.

【Key words】 Integrin; Oligodeoxynucleotides; Infrasound; Human umbilical vein endothelial cell; F-actin

次声是频率低于 20 Hz 的声波, 一般不能被人耳听到。次声广泛存在于自然环境、工业生产环境、交

通环境、军事环境以及人体中。次声和超声波一样属机械波, 以弹性震荡波的形式传播, 以近似于机械拉伸力的方式作用于机体组织。一定声压级水平的次声作用于机体, 可产生多种生物学效应^[1]。近年对次声生物学效应的研究逐渐增多, 但次声作为物

理学信号传入细胞内产生生物学效应的途径尚不清楚。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)-整合素-细胞骨架(cytoskeleton, CSK)轴系统是力学信号传导的主要途径之一^[2,3]。在这一信号传导途径中,整合素作为一组跨膜糖蛋白,由 a、b 两条多肽链组成的异二聚体,通过识别包含 RGD 序列的多肽点与基质蛋白相互作用,而在细胞内的黏附斑通过接头蛋白与肌动蛋白纤维束状结构(即应力纤维)连接,并对基因表达中转录后过程产生影响^[4]。其中,整合素 $\beta 1$ 亚基是占比例最大的整合素家族。本实验采用整合素 $\beta 1$ 核苷酸技术,并用激光扫描共聚焦显微镜进行观察,探讨次声信号向细胞内传导的途径。

材料和方法

一、材料

1. 次声设备:次声压力舱系统及次声检测系统由第四军医大学、航天工业总公司及中科院声学所协作研制。次声压力舱系统包括低频信号发生器、功率放大器、电动扬声器及舱体。检测系统主要包括次声传感器和次声信号数据采集分析系统。

2. 其它仪器及试剂:PRMI-1640 细胞培养基购自美国 Gibco 公司;培养板购自美国 Costar 公司;异硫氰酸荧光素-鬼笔环肽(fluorescein isothiocyanate-phalloidin, FITC-phalloidin)购自美国 Sigma 公司;脂质体 2000 转染试剂(Lipofectamine 2000 Reagent)购自美国 Invitrogen 公司;激光扫描共聚焦显微镜为美国 Bio-Rad 公司生产,并使用 Bio-Rad 公司软件控制;倒置荧光显微镜为德国 Carl Zeiss 公司生产。

3. 整合素寡核苷酸的设计与合成:从 GenBank 中查取人整合素 $\beta 1$ 的基因序列,选择编码区 mRNA 起始密码子附近区域定位 86-115,设计出整合素正义寡核苷酸(sense oligodeoxynucleotide, SODN)和整合素反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)序列,正义链 3'-CTGGATTGGACTGATCACT-TCAGTTTGCTG-5' 寡核苷酸序列和反义链 5'-CAG-CAAAGTGAAGTATGATCACTCAATCCAG-3' 寡核苷酸序列由大连 Takara Biotech 公司合成,硫代修饰寡核苷酸片断两端各两个碱基以增加其稳定性。

二、细胞培养及实验分组

人脐静脉血管内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells) ECV-304 由第四军医大学预防医学系放射医学教研室提供,作常规培养;待细胞性能稳定,在对数生长期按 4×10^4 个细胞/孔接种于预先放置细胞玻璃爬片的 24 孔培养板中,并置于含 5% CO_2 、37℃ 孵箱中培养;待细胞贴壁后分为次声假暴露组、次声假暴露 + ASODN 组、次声假暴露 + SODN

组、次声暴露组、次声暴露 + ASODN 组和次声暴露 + SODN 组,每组 6 孔细胞。

三、寡核苷酸转染细胞

按试剂公司脂质体介导下寡核苷酸转染说明进行细胞转染,寡核苷酸与脂质体比例为 $1 \mu\text{g}:2 \mu\text{l}$,并将脂质体和寡核苷酸复合物按分组加入各组细胞,次声假暴露组和次声暴露组细胞加入等量的 1640 无血清培养液。孵育 4 h 后,各组细胞补加含 10% 小牛血清的完全细胞培养液继续孵育 2 h 后进行次声暴露。

四、次声暴露

次声舱经严格消毒,将细胞培养板置于舱内。次声暴露组、次声暴露 + ASODN 组和次声暴露 + SODN 组采用频率 16 Hz、声压输出 130 dB 的次声作用 2 h。次声假暴露组、次声假暴露 + ASODN 组、次声假暴露 + SODN 组的细胞标本置于同一次声舱内,但无声压输出。次声作用结束后 2 h 进行 F-actin 的检测。

五、FITC-phalloidin 染色及定量分析

取细胞爬片,弃去细胞培养液;用 4% 多聚甲醛于室温下固定 30 min;用 0.01 mol/L PBS 清洗 2 次,每次 3 min;用 0.2% Triton X-100 于室温下渗透 10 min;用 0.01 mol/L PBS 清洗 2 次,每次 3 min;加入 FITC-phalloidin 5 mg/ml,于 37℃ 下孵育 30 min;用 0.01 mol/L PBS 清洗 2 次,每次 3 min;用 50% 甘油封片,避光待检。激光扫描共聚焦显微镜激发 FITC 产生绿色荧光,观察并记录细胞图像,用激光扫描共聚焦显微镜自带软件测定图像中单个细胞的 FITC 荧光强度值(每一细胞爬片标本中任选 6 个边界形态清楚的细胞测定,取平均值)。

六、统计学分析

所得数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,用 SPSS 11.0 版统计软件包处理,多组均数间比较采用单因素方差分析,两组均数间比较采用 q 检验。

结 果

次声假暴露组细胞内的 F-actin 呈绿色荧光,大部分荧光物质呈弥漫状态,细胞形态呈圆形、梭形或多边形,界限清楚,胞膜荧光较强且连续,胞浆内可见少量肌动蛋白纤维丝,方向不规则,长短不一,部分细小短促,部分呈网状,较长的可横贯细胞。次声假暴露 + SODN 组和次声假暴露 + ASODN 组细胞的 F-actin 与次声假暴露组比较,其形态和结构没有明显差别;荧光强度检测与次声假暴露组比较,差异也无统计学意义。16 Hz、130 dB 次声作用 2 h 的次声暴露组和次声暴露 + SODN 组细胞胞浆内 F-actin 微

丝明显粗、长,荧光物质大多为较长的粗大应力丝,沿细胞纵轴排列较多,数量及荧光强度明显增加,细胞膜和次声假暴露组一样,较完整而且荧光较强;而次声暴露 + ASODN 组细胞内的 F-actin 表达增多不明显,荧光强度测定较次声假暴露组稍强,但差异无统计学意义。见表 1。

表 1 130 dB、16 Hz 次声暴露后 2 h 各组细胞平均荧光强度值($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	荧光强度
次声假暴露组	6	76.5 ± 19.0
次声假暴露 + ASODN 组	6	69.2 ± 15.0 ^a
次声假暴露 + SODN 组	6	74.7 ± 17.3 ^a
次声暴露组	6	134.6 ± 32.2 ^b
次声暴露 + ASODN 组	6	81.7 ± 18.5 ^a
次声暴露 + SODN 组	6	131.4 ± 27.4 ^b

注:与次声暴露组比较,^a $P < 0.01$;与次声假暴露组比较,^b $P < 0.01$

讨 论

目前,对于细胞外化学信号跨膜转导的认识已比较清楚,而对于细胞外物理信号,尤其是机械信号的感受和跨膜传导机制了解甚少。次声可引起生物体共振,一定声压级水平的次声可造成包括心、肺、脑在内的多种器官明显的损伤,但次声信号传入细胞的过程尚不清楚。ECM-整合素-CSK 轴系统是主要的力学信号传导通路之一,是指由细胞骨架形成的网络将细胞外基质、胞浆及胞核有机地联系在一起的途径。细胞骨架是一个复合的细胞结构系统,由微管、微丝和中间丝组成,是横跨在细胞核和质膜内侧面的一种纤维状蛋白质,其主要功能是维持细胞的特定形状、细胞运动和变形等。在对细胞力学的研究中,细胞骨架又是外力传递的一个极重要的环节,其中以聚合态微丝 F-actin 最为重要,它与膜整合蛋白相连,是跨膜力由外面向内部传递的一个重要途径。已有实验证实,细胞骨架可通过张力模式进行力学信号的传导,认为细胞可能由分离的硬质管道通过一系列连续的弹性丝状物相互联系,使其网络中的结构处于张力环境中,并使细胞产生原张力^[5]。

Actin 是微丝的基础蛋白,在胞内以聚合态即 F-actin 和游离态 G-actin 两种状态存在。在正常情况下,细胞内的两种 actin 处于平衡状态,在受一定的外界力学刺激后,细胞内游离的 G-actin 彼此结合形成 F-actin,进而通过自身螺旋形成微丝,此过程即细胞

骨架重排。在力学传导过程中,F-actin 起着更为重要的作用。以往的实验已证实,次声作用可使细胞内聚合态 F-actin 的表达增加^[6]。本实验结果显示,未进行次声暴露的(包括次声假暴露组、次声假暴露 + SODN 组和次声假暴露 + ASODN 组)细胞,因无外界力学信号影响,聚合态微丝蛋白 F-actin 表达无明显差别。次声暴露后(包括次声暴露组和次声暴露 + SODN 组)的细胞 F-actin 表达明显增加,应力丝相对于未进行次声暴露的细胞粗、长,在细胞内沿细胞长轴方向排列较多,方向性明显,荧光强度也明显增加。国外学者在研究内皮细胞对液体剪切力的反应中也发现,内皮细胞与应力纤维沿着液流方向排列较多,这种现象可能与受力有关^[7]。次声暴露可使细胞内 F-actin 的表达明显增强,而次声暴露 + ASODN 组的细胞与未进行次声暴露的细胞比较,F-actin 表达稍有增加,但明显少于单纯次声暴露的细胞,这可能与整合素 $\beta 1$ 反义寡核苷酸部分阻断了经整合素向细胞骨架传导的力学信号相关,说明次声信号和其它力学信号一样,也可经过 ECM-整合素-CSK 轴系统传导。

总之,本实验提示了次声信号可经 ECM-整合素-CSK 轴系统这一途径传导,整合素 $\beta 1$ 反义寡核苷酸可部分阻断这一途径,本结果对研究次声的生物学作用机制及进一步的次声防护有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] 陈景藻. 次声的产生及生物学效应//总后勤部卫生部,主编. 医药卫生科学技术进展. 北京:军事医学科学出版社,1997:194-197.
- [2] Mikuni-Takagaki Y. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. J Bone Miner Metab,1999,17:57-60.
- [3] Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. Science,1993,260:1124-1127.
- [4] Chicurel ME, Signer RH, Meyer CJ, et al. Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. Nature,1998,392:730-733.
- [5] Ingber DE. Cellular tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. Annu Rev Physiol,1997,59:575-599.
- [6] 王冰水,陈景藻,郭国祯,等. 次声暴露对血管内皮细胞骨架微丝 F-actin 表达的影响. 中华物理医学与康复杂志,2006,28:28-31.
- [7] Girard PR, Nerem RM. Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins. J Cell Physiol,1995,163:179-193.

(收稿日期:2008-10-20)

(本文编辑:吴 倩)