

· 基础研究 ·

次声暴露对血管内皮细胞骨架微丝 F-actin 表达的影响

王冰水 陈景藻 郭国祯 任东青 李玲 曾桂英 方恒虎 刘静 陈丹

【摘要】目的 研究 16 Hz, 90, 110 及 130 dB 的次声作用对人脐血管内皮细胞 (ECV-304) 骨架 F-actin 表达的影响。**方法** 将 ECV-304 接种于细胞爬片上, 并将其分为对照组和 90, 110, 130 dB 次声暴露组。各次声暴露组均接受 2 h 相应强度的次声作用, 对照组则作次声假暴露处理。于次声作用后即刻、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h 及 24 h 分别对各组细胞进行 F-actin 免疫荧光染色检测, 同时应用激光扫描共聚焦显微镜观察各组细胞 F-actin 的表达变化, 记录并测定其 F-actin 的平均荧光强度。**结果** 对照组细胞中的大部分荧光样物质呈弥漫状态, 胞膜荧光较强, 胞浆内可见少量肌动蛋白纤维丝, 方向不规则, 长短不一。即刻观察经不同声压级次声作用后的 3 组细胞, 均可见其胞浆中微丝 F-actin 明显粗大、变长, 其间的荧光样物质大多为较长的粗大应力丝, 沿细胞纵轴排列较多, 细胞数量及荧光强度明显增加, 细胞膜与对照组类似, 均结构完整且荧光增强; 在次声作用后 8 h 时, 各次声暴露组细胞的 F-actin 仍处于高表达状态; 随着时间的延长, 其 F-actin 表达逐渐降低; 当次声作用后 24 h 时, 各次声暴露组 F-actin 与对照组已无显著性差异。不同声压级次声暴露组细胞的 F-actin 变化趋势均基本一致, 3 组细胞的 F-actin 表达在各检测时间点均未见显著性差异。**结论** 16 Hz, 90 dB, 110 dB 及 130 dB 的短时次声暴露均可诱导人脐血管内皮细胞 F-actin 表达改变, 导致其骨架重建; 并且由短时次声作用诱发的细胞骨架改建可在次声暴露结束后 24 h 时恢复正常。

【关键词】 次声; 人脐血管内皮细胞; 聚合态肌动蛋白; 激光扫描共聚焦显微镜

Effects of exposure to infrasound on the expression of cytoskeleton filament F-actin in vascular endothelial cell-304 WANG Bing-shui, CHEN Jing-zao, GUO Guo-zheng, REN Dong-qing, LI Ling, ZENG Gui-ying, FANG Heng-hu, LIU Jing, CHEN Dan. Department of Rehabilitation, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xian 710032, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of exposure to infrasound of different intensities on the expression of F-actin in vascular endothelial cell-304 (ECV-304). **Methods** The ECV-304 primary culture cells were exposed to infrasound of 0 dB (the control group), 90 dB, 110 dB, 130 dB, respectively, for 2 hours. Laser scanning confocal microscope was used to examine the changes of F-actin after immunofluorescent staining at 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h and 24 h after treatment and the photos were taken for further analysis of the cell average fluorescence. **Results** In the control group, most fluorescein-labelled substance was scattered in the cells, and few actin filaments were observed with irregular alignment, while the expression of F-actin in the experimental groups was thicker, longer and showed in longitudinal arrangement after exposure, and the intensity of fluorescence was significantly increased. In all groups, complete and strong fluorescence was observed at cellular membrane. The over-expression of F-actin in the experimental groups was kept obviously for 8h, however there was no significant difference of the F-actin expression between the experimental groups and the control group 24 h later. The expression of F-actin in all the experimental groups was synchronous, and there was no obvious difference at each time point. **Conclusion** F-actin expression in ECV-304, exposed to infrasound with intensity output of 90 dB, 110 dB, 130 dB and frequency of 16 Hz, could be changed, and recuperated 24 h after infrasound exposure.

【Key words】 Infrasound; ECV-304; F-actin; Laser scanning confocal microscope

次声是频率为 0.000 1 ~ 20 Hz 的一类声波, 它广泛存在于自然、军事、工业生产、交通以及人体环境中, 人耳一般不能察觉, 但次声可对人体产生多种生物学效应^[1]。近年来涉及次声生物学效应的研究逐渐增多, 并

发现一定声压级的次声可对中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统、听觉系统、生殖系统及多种器官功能产生影响, 但其诱发细胞内生物学效应的途径目前尚不清楚。微丝骨架是细胞骨架的一种, 与诸如维持细胞形态、参与细胞分裂、细胞运动、细胞内物质转运及信号转导等多种功能密切相关; 一般认为细胞外基质-整合素-细胞骨架轴是细胞感受外界机械信号并将其转化为生化信号的主要途径^[2-4]。本研究观察了经不同声压级次

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院物理医学与康复科 (王冰水、陈景藻、刘静); 第四军医大学预防医学教研室 (郭国祯、任东青、曾桂英、方恒虎); 基础部电镜中心 (陈丹); 北京解放军 304 医院康复医学科 (李玲)

声作用后血管内皮细胞 F-actin 表达的变化,以进一步探讨次声信号向细胞内的传导途径。现报道如下。

材料与方法

一、实验材料

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与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. 仪器及试剂:PRMI-1640 细胞培养基购自美国 Gibco 公司,培养板购自 Costar 公司;异硫氰酸荧光素-鬼笔环肽(FITC-phalloidin)和碘化丙啶(PI)均购自美国 Sigma 公司;采用 Bio-Rad 公司出品的软件控制激光扫描共聚焦显微镜(Laser scanning confocal microscope, LSCM),倒置荧光显微镜由 Carl Zeiss 公司生产。

3. 细胞培养:利用已建株的人脐血管内皮细胞 ECV-304(第四军医大学预防医学系提供)作常规培养,于对数生长期按 2×10^4 个细胞/孔接种于预先放置有细胞玻璃爬片的 24 孔培养板中,待细胞贴壁状态稳定后进行实验。

二、次声作用及检测方法

1. 分组及次声暴露:将上述细胞随机分为对照组、90 dB 暴露组(次声频率 16 Hz)、110 dB 暴露组(次声频率 16 Hz)及 130 dB 暴露组(次声频率 16 Hz)。实验前,严格消毒次声舱,将各暴露组细胞培养皿置于舱内作用 2 h,次声频率为 16 Hz,并分别设置相应的次声作用强度(分别为 90 dB、110 dB、130 dB);对照组也置入同样环境中作假暴露,此时次声声压级输出强度为 0 dB。当次声作用结束后,将各组细胞放回细胞孵育箱。共设定 7 个时间点(即次声作用后即刻、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h 及 24 h)分别对各暴露组细胞进行检测,每个时间点取 6 个孔的细胞标本;同时取对照组的细胞标本与之对照。

2. FITC-phalloidin 与 PI 的双标染色及定量分析:分别于各相应时间点提取细胞爬片标本,并置入 4% 多聚甲醛液中固定 30 min(室温环境下),PBS 液清洗 3 min $\times$ 2,随后置入 0.2% Triton X-100 溶液内渗透 10 min,再次用 PBS 液清洗 3 min $\times$ 2;然后加入 FITC-phalloidin(5 mg/ml, 37 °C 环境下)孵育 30 min,用 PBS 液清洗 3 min $\times$ 2,再加入 PI(20 mg/ml)作用 30 min,用

PBS 液清洗 3 min $\times$ 2,随后用 50% 甘油封片并避光待检。LSCM 可激发 FITC 产生绿色荧光、PI 产生红色荧光(细胞核衬染)。观察并记录细胞图像,用 LSCM 自带软件测定图像中单个细胞的 FITC 荧光强度值(每一张细胞爬片标本任选 6 个边界形态清楚的细胞经测定后取其平均值)。

三、统计学分析

实验所得各组细胞荧光强度值以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS 11.0 版统计软件包做重复测量的方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

未给予次声暴露处理的对照组 ECV-304 细胞经固定染色后,于激光共聚焦显微镜下可观察到 F-actin 呈绿色荧光样物质,大部分呈弥漫状态,细胞形态呈圆形、梭形或多边形,界限清楚,胞膜荧光较强,胞浆内可见少量肌动蛋白纤维丝,方向不规则且长短不一,部分细小并呈网状分布,较长的纤维丝可横贯细胞全长;经 PI 衬染的细胞核呈红色,外观呈圆形;对照组细胞在各不同检测时间点的差异均无统计学意义(图 1)。暴露组细胞经次声作用 2 h 后即刻检测,未发现其形态显著改变,也以圆形、梭形及多边形常见,界限清楚,胞浆 F-actin 微丝明显增粗、增长,荧光样物质大多为较长的粗大应力丝,多数沿细胞纵轴排列,小部分呈网状交叉排列,另有少量微丝呈弥漫状态分布,整个细胞的 F-actin 表达量及荧光强度均显著增加,其细胞膜形态也与对照组类似,结构完整且荧光强度增加(图 2)。3 组暴露组细胞经不同声压级的次声作用后,在 8 h 内其 F-actin 均处于高表达状态(图 3),与对照组比较,差异均有统计学意义;各暴露组细胞在各时间点的变化趋势基本一致,差异无统计学意义;各暴露组细胞在 12 h 时的 F-actin 表达量开始逐渐减少,并于 24 h 时接近对照组水平(图 4)。荧光强度检测结果与肉眼观察结果基本一致,即次声作用后前 8 h 内,各暴露组细胞荧光强度均明显高于对照组($P < 0.05$);随着时间的延长,其荧光强度逐渐降低,于 24 h 时,各暴露组与对照组间 F-actin 表达量已无显著性差异;另外各暴露组细胞在相同时间点的细胞荧光强度均差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组细胞在不同时间点的荧光强度值及变化趋势详见表 1 和图 5。

表 1 经次声作用后各组细胞不同时间点平均荧光强度的比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

组 别	次声暴露后检测时间点						
	即刻	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
对照组	79.6 $\pm$ 19.7	81.2 $\pm$ 23.8	76.5 $\pm$ 19.0	83.4 $\pm$ 24.9	79.6 $\pm$ 18.7	77.2 $\pm$ 18.3	75.6 $\pm$ 12.5
90 dB 组	121.6 $\pm$ 23.6 **	130.2 $\pm$ 28.4 **	129.8 $\pm$ 31.2 **	123.9 $\pm$ 23.8 **	105.7 $\pm$ 25.5 *	87.3 $\pm$ 17.3	80.1 $\pm$ 19.9
110 dB 组	125.1 $\pm$ 27.9 **	127.7 $\pm$ 30.1 **	133.4 $\pm$ 29.4 **	125.6 $\pm$ 31.1 **	104.3 $\pm$ 22.7 *	89.0 $\pm$ 19.8	77.9 $\pm$ 22.4
130 dB 组	132.7 $\pm$ 22.4 **	134.6 $\pm$ 27.6 **	137.6 $\pm$ 36.2 **	122.7 $\pm$ 30.5 **	113.3 $\pm$ 29.1 *	93.8 $\pm$ 25.3	77.6 $\pm$ 21.4

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;各暴露组相应时间点比较, $P > 0.05$

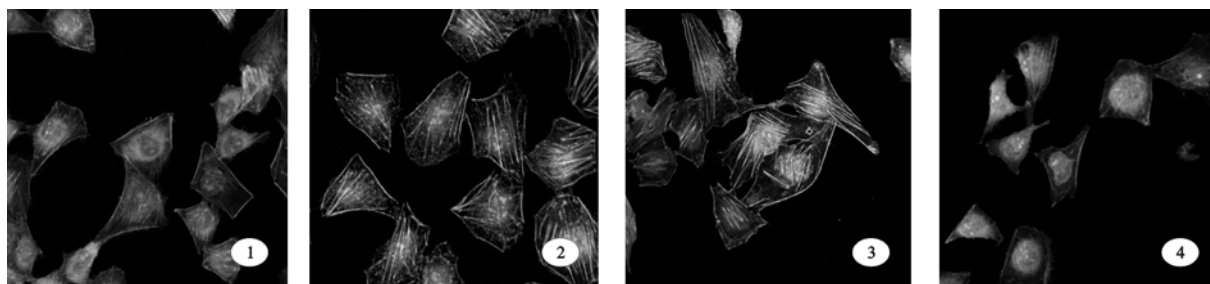


图1 对照组 ECV-304 细胞骨架形态(1.1×400); 图2 经 130 dB、16 Hz 次声作用后即刻 ECV-304 细胞骨架的形态(1.3×400); 图3 经 130 dB、16 Hz 次声作用后 4h 时, ECV-304 细胞骨架的形态(1.3×400); 图4 经 130 dB、16 Hz 次声作用后 24 h 时, ECV-304 细胞骨架的形态(1.0×400)

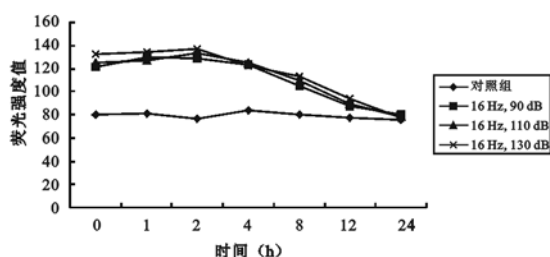


图5 各组细胞经次声作用后的荧光强度值变化情况

讨 论

相关研究表明,一定声压级的次声可造成包括心、肺、脑在内的多种器官明显损伤^[5,6]。一般认为次声可引起生物组织共振,并将其机械能转化为生物信号或引起生物分子构象改变,进而诱发各种生物学效应,如次声作用可引起血管内皮细胞发生损伤性改变,而血管内皮细胞损伤往往又是脏器损伤的基础。有研究表明,大鼠经 8 Hz、120 dB 的次声作用后,其脑组织超微结构可发生损伤性改变,同时其血管内皮细胞受损,进而引发血-脑屏障通透性增高^[7,8];而 8 Hz、110 dB 的次声作用 3 h 后即可引起大鼠肺泡毛细血管红细胞充盈,造成受损部分气体代谢功能障碍^[5];8 Hz、130 dB 的次声可引起心肌细胞超微结构损伤性改变^[9],诱导大鼠心脏内皮细胞损伤,并观察到有内皮细胞凋亡蛋白 Bax、Bcl-x 等物质的表达。次声引起血管内皮细胞损伤,可能与内皮素 (ET-1)、NO^[10] 及细胞内钙^[11] 等的改变有关。

细胞骨架体系是细胞的重要组成部分之一,细胞骨架共有 3 种基本结构,包括微丝、微管与中间丝。细胞骨架结构与细胞膜及核膜上的蛋白脂质分子相连,维持细胞形态并参与细胞运动、分裂等多种功能,是跨膜力学信号传递的结构基础,也是细胞赖以生存、分化和生长的重要内部环境基础。Actin 在细胞内以聚合态 F-actin 和游离态 G-actin 形式存在。G-actin 为单体分子球形蛋白,可溶于胞浆, F-actin 呈纤维状,是构成细胞骨架的主要成分, F-actin 较 G-actin 具有更明显的

生物学效应。微丝由双股 F-actin 螺旋式组装而成,正常情况下细胞内的两种 actin 处于动态平衡状态,当受到一定的因素刺激后,细胞内游离的 G-actin 彼此结合形成 F-actin,进而通过自身螺旋组装形成微丝,此过程即细胞骨架重排。激光扫描共聚焦显微镜是近年发展起来的新型光学显微镜,为 F-actin 的图像及定量分析提供了条件^[12],发现当细胞受机械外力刺激后,可引起其结构及功能等多方面改变^[13-15]。对细胞施加外力刺激的方式有多种,目前用于应力相关研究的机械刺激模型包括:低渗膨张力、静气压力、机械拉伸力、流体剪切力以及以离心的方式对细胞施以顶轴向力等,其中对流体剪切力的生物学效应研究较多;次声与可听声、超声一样,也是一种机械波,以震荡的方式进行传播。当次声作用于细胞时,可产生一种近似于机械拉伸的外力,从而对细胞形态、结构等产生一定的影响。

16 Hz 的次声是自然和人工环境中常见频率的次声,它对机体有明显的生物学效应,如有研究发现,一定声压级的次声(频率 16 Hz)可引起组织器官、中枢神经系统及应激等多方面的改变^[16-18];动物实验表明,大鼠经 16 Hz 次声作用后,可引起其肺组织出现针尖样大小的出血点,电镜下可发现大鼠血管内皮细胞基底膜受损、结构紊乱,线粒体肿大,嵴模糊,内质网扩张等^[16],当引起脑血管内皮细胞损伤时,可导致血脑屏障通透性增加^[19]。

本研究将血管内皮细胞接种于盖玻片上,并保证细胞充分粘附、伸展,能更准确地反映经次声作用后细胞骨架的改变。各暴露组细胞经不同声压级的次声作用 2 h 后即刻,均可观察到其微丝明显变粗、变长,数量增多,荧光增强,表明细胞经 16 Hz、90 dB、110 dB 或 130 dB 的次声短时作用后,其 F-actin 表达增加,细胞骨架重排,与剪切力刺激引发的细胞骨架结构改变类似^[11]。细胞经次声作用后一定时间内,其 F-actin 持续处于高表达水平,随着时间的延长,其 F-actin 表达量逐渐减少,如在次声作用后 8 h 内,其细胞 F-actin 荧光强度显著高于对照组,直到 24 h 时,其 F-actin 的表达

才与对照组趋于一致,说明短时次声作用即可引起细胞微丝的重建或改建,推测次声作用后细胞骨架的这种改变与细胞的多种功能变化相关,并可使机体组织产生进一步的生物学效应。在次声作用结束后一定时间内,细胞的 actin 水平又可重新处于平衡状态。众所周知,细胞骨架与细胞功能状态密切相关,本研究结果提示细胞被声压级小于 130 dB 的次声短时作用后,可能不会引起细胞骨架的不可逆性改变;同时次声刺激动物实验结果表明,那些体内产生显著生物学效应的动物大多接受过多次次声暴露处理。目前一般认为细胞外基质-整合素-细胞骨架轴系统是力学信号向细胞内传导的主要途径之一,次声波与其它机械力有相似之处,但也有不同之处,且次声作用的确可引起细胞骨架改变;由于细胞骨架属于细胞的有形成分之一,次声波是否经细胞外基质-整合素-细胞骨架轴系统使机体产生生物学效应,或是否直接作用于细胞骨架还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈景藻. 次声的产生及生物学效应. 北京:军事医学科学出版社, 1997. 194-197.
- 2 Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 1993, 260: 1124-1127.
- 3 Mikuni-Takagaki Y. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab*, 1999, 17: 57-60.
- 4 Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*, 1995, 57: 344-358.
- 5 李唯,贾克勇,李焕章,等. 8 Hz 和 16 Hz 次声对大鼠肺组织及肺氧合功能的影响. 第四军医大学学报, 2001, 22: 1485-1489.
- 6 Harris CS, Sommer HC, Johanson DL. Review of the effects of infrasound on man. *Aviat Space Environ Med*, 1978, 49: 582-586.
- 7 费舟,章翔,王小峰,等. 次声作用后鼠脑超微结构与血脑屏障改变. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21: 134-137.
- 8 费舟,章翔,李树合,等. 次声对脑组织血栓素 A₂、前列环素代谢的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22: 270-272.
- 9 裴兆辉,朱妙章,陈景藻,等. 8 Hz, 130 dB 次声引起心肌组织超微结构的变化. 第四军医大学学报, 2004, 25: 991-993.
- 10 裴兆辉,陈景藻,朱妙章,等. 次声诱导的大鼠心肌细胞凋亡和血管内皮损伤. 第四军医大学学报, 2004, 25: 97-99.
- 11 刘朝晖,陈景藻,王志鹏,等. 8 Hz, 130 dB 次声对大鼠海马细胞内钙离子浓度的影响. 第四军医大学学报, 2004, 25: 304-306.
- 12 赵启韬,苗俊英. 激光共聚焦显微镜在生物医学研究中的应用. 北京生物医学杂志, 2003, 22: 52-54.
- 13 Sims JR, Karp S, Ingber DE. Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. *J Cell Sci*, 1992, 103: 1215-1222.
- 14 Meazzini MC, Toma CD, Schaffer JL, et al. Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain in vitro. *J Orthop Res*, 1998, 16: 170-180.
- 15 Hughes-Fulford M, Lewis ML. Effects of microgravity on osteoblast growth activation. *Exp Cell Res*, 1996, 224: 103-109.
- 16 李唯,贾克勇,李焕章,等. 次声对大鼠肺组织损伤及肺氧合功能的影响. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19: 194-197.
- 17 赵志刚,陈景藻,张李燕,等. 次声作用后大鼠血浆中血管紧张素 II 含量的改变. 中华物理医学与康复杂志, 2001, 23: 83-86.
- 18 牟翔,陈景藻,李玲,等. 次声导致小鼠脑损伤的生化指标研究. 中国康复, 2001, 5: 61-62.
- 19 费舟,章翔,王晓峰,等. 次声作用后鼠脑超微结构与血脑屏障的改变. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21: 134-135.
- 20 Noria S, Xu F, McCue S, et al. Assembly and reorientation of stress fibers drives morphological changes to endothelial cells exposed to shear stress. *Am J Pathol*, 2004, 164: 1211-1223.

(修回日期:2005-09-19)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

康复医学新书资讯

国内第一套大型康复医学教材“医学院校康复治疗学专业教材”已经由北京华夏出版社出版,主编单位是首都医科大学康复学院、南京医科大学康复系。

该套教材的特点是既吸取了国际上的先进理念,又侧重考虑了我国的实际特点;既有循序渐进的基础理论知识,又有实用的诊疗方法,同时注重基本理论、知识、技能相结合。本套教材适用于毕业前及毕业后教育,亦可作为临床人员的工具用书。

本套大型教材共有 19 本:包括《康复医学导论》吴弦光主编,定价 14 元;《人体发育学》江钟立主编,定价 17 元;《运动学》周士枋主编,定价 38 元;《临床作业疗法学》王刚、王彤主编,定价 75 元;《基础作业学》陈立嘉主编,定价 21 元;《物理疗法与作业疗法概论》桑得春、吴卫红主编,定价 18 元;《言语治疗学》李胜利主编,定价 25 元;《运动疗法技术学》纪树荣主编,定价 75 元;《临床康复学》关骅主编,定价 60 元;《康复心理学》贺丹军主编,定价 32 元;《康复疗法评定学》恽晓平主编,定价 75 元;《临床运动疗法学》励建安主编,定价 40 元;《文体疗法学》金宁主编,定价 35 元;《理疗学》乔志恒主编,定价 35 元;《日常生活技能与环境改造》汪家琮主编,定价 39 元;《假肢与矫形器学》赵辉三主编,定价 48 元;《中国传统康复治疗学》许建鹏、高文铸主编,定价 60 元;《物理疗法与作业疗法研究》刘克敏主编,定价 25 元;《社区康复学》赵悌尊主编,定价 40 元。

有购书意向者,我社可给予适当优惠,并免费邮寄。联系地址:100028 北京东直门外香河园北里 4 号华夏出版社发行部;联系人:袁潮;电话:13911264672, 010-64663331-3006;传真:64626652。