

不同声强超声波对细胞骨架微丝 F-actin 表达的影响

王冰水¹ 袁华¹ 王斌¹ 牟翔¹ 刘卫¹ 刘静¹ 陈丹²

摘要 目的:研究不同声强超声波对人脐血管内皮细胞(ECV-304)细胞骨架 F-actin 表达的影响,探讨超声波对人体的作用机制。方法:将人脐血管内皮细胞 ECV-304 接种于 6 孔板中,分别以频率 800kHz,占空比为 30%功率密度 0.20、0.40、0.60 和 0.80W/cm²,的脉冲超声波辐射 5min,于辐射后不同时间,对 ECV-304 细胞进行 F-actin 免疫荧光染色,应用激光扫描共聚焦显微镜,观察细胞 F-actin 表达的改变,测定单个细胞 F-actin 的平均荧光强度。结果:假辐射组细胞有中等量的 F-actin 表达,荧光物质部分呈弥漫状态,部分呈线形应力丝状态,细胞膜荧光较强,胞浆内的肌动蛋白纤维丝,方向不规则,长短不一。四组不同强度超声波辐射后的细胞变化较为一致,辐射后均可看到胞浆中微丝 F-actin 粗大纤丝,弥漫状态的荧光物质相对较少,应力丝沿细胞纵轴排列较多,数量及荧光强度也明显增加,细胞膜荧光较强,超声波辐射的四组细胞之间没有明显的差别。随时间的延长细胞应力丝逐渐减少,12h 时已接近正常组细胞,各组细胞的变化是同步的。结论:800kHz 的脉冲式超声波辐射 ECV-304 细胞可诱导 F-actin 表达的改变,导致细胞骨架重建,超声波强度 ≤0.80W/cm² 时,引起的细胞骨架改变是可逆的。

关键词 超声;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

中图分类号:R454.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-06-0515-03

The expressions of cytoskeleton filament F-actin of EVC-304 cells exposed to ultrasound in different intensities/WANG Bingshui, YUAN Hua, WANG Bin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(6):515-517

Abstract Objective:To observe the expressions of F-actin in ECV-304 (human umbilical vein endothelial cells) cells exposed to ultrasound in different intensity outputs. **Method:**After primary culture on coverglass, ECV-304 cells were divided into five groups. In experimental groups, the cells were exposed by ultrasound, frequency of 800kHz, 30% duty cycle, with intensity output of 0.20, 0.40, 0.60 and 0.80W/cm² respectively for 5 min. The cells in control group were managed in the same environment as experimental groups but without ultrasound outputs. Laser scanning confocal microscope was used to examine the changes of cytoskeleton filament F-actin after immunofluorescent staining and the photos were taken for further analysis of cells' average fluorescence by spectrofluorimetric quantification. **Result:**Cells in control group, some fluorescein-labelled substance was in diffusion states. Less actin filaments were tenuous, short and with irregular arrangement. Correspondingly, F-actin in the cells of experimental groups was thick, long and with longitudinal arrangement after exposure. The intensity of fluorescence increased significantly. There was a membrane-like boundary strong fluorescence. More F-actin expressions in experimental groups were being kept obviously for hours. However, 12h later there was no significant difference in F-actin expressions between experimental groups and control group. Anyway, cells in experimental groups showed synchronous changes. **Conclusion:**F-actin expressions in ECV-304 cells can be changed by 800kHz ultrasound exposures with different intensity outputs in the experiment. The reversible expressions of F-actin indicates that the changes of cell skeleton reconstruction induced by 0.80W/cm² or less ultrasound exposure are reversible.

Author's address Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032

Key words ultrasound; human umbilical vein endothelial cell; F-actin; laser scanning confocal microscope

超声波是指频率在 20 kHz 以上的机械振动波。作为一种传统的物理因子,超声波在临床诊断和治疗中被广泛应用,超声波的常规治疗病种几乎涉及临床的各个学科^[1]。近年对超声波的生物学效应进行了大量的研究,但超声波作为一种机械物理学信号,如何传入细胞内并产生生物学效应的途径尚不十分清楚。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细胞功能密切相关。一般认为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)-整合素-细胞骨架(cytoskeleton, CSK)是细胞感受力学信号并将其转化为生化信号的主要途径^[2-3]。本实验应用不同

1 第四军医大学西京医院物理医学与康复科,西安,710032

2 第四军医大学电镜中心

作者简介:王冰水,男,副主任医师,副教授,博士

收稿日期:2008-10-31

强度的超声波辐照人脐静脉血管内皮细胞 (ECV-304), 观察超声波辐照后血管内皮细胞 F-actin 表达的改变, 进一步探讨超声波的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器及试剂: 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)为 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 Carl Zeiss 公司生产。超声波治疗机为意大利 Cosmogamma US10 型。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, Sigma 公司), 碘化丙啶(PI, Sigma 公司)。

1.1.2 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, 在对数生长期按 5×10^4 个细胞接种于 6 孔培养板中, 每孔预先放置 6 片细胞爬片, 而后置于含 5%CO₂、37°C 孵箱中培养, 细胞贴壁状态稳定后进行实验。

1.2 方法

1.2.1 分组及超声波辐射: 分为对照组及 0.20、0.40、0.60 和 0.80W/cm² 超声波辐射组, 每组 6 孔细胞, 共 30 孔细胞。超声波频率 800kHz, 占空比 30%。实验组细胞共分 5 个时间点, 即超声作用后即刻、第 2、4、8、12 小时等, 每个时间点从 6 孔细胞标本中各取出一张细胞爬片进行观察。实验前将超声波声头消毒, 以幅杆固定声头浸入细胞培养液进行辐射, 根据分组不同, 选用不同的辐射强度, 每组辐射 5min。对照组也在同样的环境做假辐射, 超声波功率输出为 0 W/cm², 并于相应的时间点设立对照。辐射后细胞继续培养。

1.2.2 FITC-phalloidin 和 PI 的双染色及定量分析: 在不同的时间点取细胞爬片; 4%多聚甲醛室温下固定 30min; 0.01M PBS 清洗 2 次, 每次 3min;

0.2%tritonX-100 室温下渗透 10min; 0.01M PBS 清洗 2 次, 每次 3min; 加入 FITC-phalloidin 5mg/ml 37°C 孵育 30min; 0.01M PBS 清洗 2 次, 每次 3min; 加入 PI 20mg/ml 30min; 0.01M PBS 清洗 3min 2 次; 50%甘油封片, 避光待检。LSCM 激发 FITC 产生绿色荧光、PI 产生红色荧光(细胞核衬染)。观察记录细胞图像, 用 LSCM 自带软件测定图像中单个细胞的 FITC 荧光强度值(每一细胞爬片标本任选 6 个边界形态清楚的细胞测定取平均值)。

1.3 统计学分析

所得各组细胞荧光强度测定值用平均值±标准差表示, 采用 SPSS11.0 统计软件包做单因素的方差分析, 同一时间点组间比较采用 *q* 检验。

2 结果

激光共聚焦显微镜下观察, 对照组 ECV-304 细胞, 可见 F-actin 呈绿色荧光, 细胞形态呈圆形、梭形或多边形, 界限清楚, 胞膜荧光较强, 部分荧光物质呈弥漫状态, 部分荧光物质为丝状肌动蛋白, 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, PI 衬染的细胞核呈红色, 外观呈圆形, 对照组不同时间点的细胞之间无明显差异(图 1, 见彩色插页)。超声波辐射后即刻, 细胞形态未见明显变化, 亦呈圆形、梭形或多边形, 界限清楚, 细胞膜完整荧光较强, 但胞浆中 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, 小部分呈网状交叉排列, 少量呈弥漫状态, 整个细胞的 F-actin 表达量及荧光强度明显增加(图 2—4, 见彩色插页)。不同声强的超声波辐射组, 在 8h 内 F-actin 均处于高表达状态, 与对照组比较均有显著差异($P < 0.05$), 实验组之间在各时间点上变化趋势较为一致, 差异不明显($P > 0.05$), 到 12h 各实验组细胞的 F-actin 表达量逐渐减少, 接近对照组。荧光强度测定各组细胞不同时间点的荧光强度值如表 1。

表 1 超声波辐射后不同时间细胞平均荧光强度比较

($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	暴露后时间				
	即刻	第 2 小时	第 4 小时	第 8 小时	第 12 小时
对照组					
0 W/cm ²	68.5±15.2	66.5±14.0	71.4±18.9	68.6±13.8	70.2±16.3
超声波辐射组					
0.20 W/cm ²	97.5±20.6 ^②	111.8±24.2 ^②	113.9±18.8 ^②	88.7±17.3 ^①	77.3±14.1
0.40 W/cm ²	109.1±18.9 ^②	113.4±20.4 ^②	112.6±21.1 ^②	82.3±14.6	71.0±15.8
0.60 W/cm ²	110.7±19.4 ^②	109.6±36.2 ^②	98.2±17.5 ^②	90.21±16.1 ^①	80.8±19.9
0.80 W/cm ²	112.1±16.5 ^②	120.6±24.2 ^②	117.2±19.4 ^②	97.1±18.8 ^①	82.0±23.6

与对照组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 实验组同一时间点之间比较均 $P > 0.05$

3 讨论

医用超声波大多利用压电效应, 把电能转换成机械振荡波而产生超声波, 它是一种疏密交替的弹

性纵波。超声波的应用非常广泛, 除了常用于与软组织损伤和疼痛相关的疾病治疗外, 近年, 低频超声波、低强度超声波、高能聚焦超声波、体外冲击波

疗法等新的治疗方法也在不断拓展超声波的应用范围^[4-7]。超声波作用于组织可产生一种近似于弹性拉压的力, 这种力学信号如何传入细胞内, 转化为化学信号并进一步产生生物学效应的过程, 还不十分清楚。

细胞骨架体系是细胞的重要组成部分, 也是感受力学信号的主要细胞结构, 细胞骨架包括微丝、微管和中间丝三种基本结构。细胞骨架结构与细胞膜及核膜上的蛋白脂质分子相连接, 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。细胞骨架微丝的组成单元是肌动蛋白(Actin), Actin在胞内以聚合态F-actin和游离态G-actin两种状态存在。G-actin为单体分子球形蛋白, 溶于胞浆。F-actin为聚合态, 呈纤维状, 具有更为明显的生物学功能, 双股F-actin螺旋式组装形成微丝, 而后者是构成细胞骨架的主要部分。正常情况下, 细胞内的两种actin处于平衡状态, 当受到力学信号刺激后, 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, 并可引起结构和功能等多方面的改变^[8-9]。对细胞施加力的方式有多种, 包括低渗膨胀力、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, 其中以流体剪切力的生物学效应研究较多, 而对机械拉伸力引起细胞变化的研究较少。

在本实验中, 超声波辐射后即刻, 辐射组即可看到F-actin的表达明显增多, 细胞内微丝变的粗长, 数量增多, 荧光增强, 表明超声波辐射后短时间内, 细胞骨架即发生了重排, 细胞骨架感受了声学信号的传导并发生了显著改变, 与剪切力引起细胞骨架改变的结果相类似^[10]。而四种不同强度超声波组之间, 细胞内F-actin表达的量差异不明显。分析这一现象, 可能与体外培养的细胞对超声波的直接作用较为敏感有关, 相对较小强度的超声波即可使细胞的F-actin处于高表达状态, 推测这种细胞骨架的改变与细胞的多种功能改变相关。细胞在超声波作用后数小时内F-actin的表达处于增加状态, 随着作用后时间的延长F-actin表达逐渐减少, 在12h时F-actin的荧光强度已接近正常, 说明实验用剂量的超声波引起细胞骨架改变是可逆的。超声波对细胞的增殖有调节作用^[11], 有报道与本实验相似强度的超声波在促进进行细胞增殖的同时, 也有部分细胞被破坏^[12]。本实验中将血管内皮细胞接种于盖玻片上,

细胞充分黏附伸展, 状态良好, 干扰因素少, 能准确地反映超声作用后细胞骨架的改变, 由荧光物质看细胞结构未见明显的脱壁、溶解和死亡。细胞骨架和细胞的功能状态密切相关, 提示可引起细胞进一步的功能变化。本结果表明一定强度的超声波辐射, 可引起细胞骨架的重建, 强度 $\leq 0.8 \text{ W/cm}^2$ 的超声波辐射, 引起的细胞骨架改变是可逆的。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, 超声波辐射可引起这一系统中细胞骨架的改变, 本实验采用了5min的辐射, 变化时间参数是否会引起细胞骨架微丝表达较大的改变, 以及细胞骨架改变后细胞的进一步的生化功能改变都有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王冰水. 超声波治疗在康复领域的应用[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2008, 30(2):130—133.
- [2] Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton [J]. Science, 1993, 260(5111):1124—1127.
- [3] Mikuni-Takagaki Y. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes [J]. J Bone Miner Metab, 1999, 17(1):57—60.
- [4] Kavros SJ, Schenck EC. Use of noncontact low-frequency ultrasound in the treatment of chronic foot and leg ulceration: a 51-patient analysis [J]. J Am Podiatr Med Assoc, 2007, 97:95—101.
- [5] Ebersson CP, Hogan KA, Moore DC, et al. Effect of low-intensity ultrasound stimulation on consolidation of the regenerate zone in a rat model of distraction osteogenesis [J]. J Pediatr Orthop, 2003, 24:2379—2385.
- [6] Haar GT, Coussions C. High intensity focused ultrasound: past, present and future [J]. Int J Hyperthermia, 2007, 23:85—87.
- [7] Ogden JA, Alvarea RG, Levitt R, et al. Shock wave therapy in musculoskeletal disorders [J]. Clin Orthop, 2001, 387:22—40.
- [8] Sims JR, Karp S, Ingber DE. Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape [J]. J Cell Sci, 1992, 103:1215—1222.
- [9] Meazzini MC, Toma CD, Schaffer JL, et al. Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain in vitro [J]. J Orthop Res, 1998, 16(2):170—180.
- [10] Girard PR, Nerem RM. Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins [J]. J Cell Physiol, 1995, 163(1):179—193.
- [11] Hill GE, Fenwick S, Mathews BJ, et al. The effect of low intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers in vitro [J]. Ultrasound Med Biol, 2005, 31(12):1701—1706.
- [12] Dedeyne PG, Kisch-Volders M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts [J]. Physical Therapy, 1995, 75(7):629—634.