

## · 基础研究 ·

直流电场对肺癌细胞移行及Integrin  $\beta$ 1的影响

闫小龙 韩静 张志培 汪健 倪云峰 高坤祥 王云杰

**【摘要】**背景与目的 目前关于直流电场对细胞影响已引起广泛关注,并认为癌症的转移及转移能力可能与趋电性有关。本研究探讨肺癌A549细胞在体外直流电场中的趋电移行,及直流电场对Integrin  $\beta$ 1及其信号通路的影响。方法 按A549细胞是否暴露于5 V/cm直流电场及暴露时间分为A, B, C, D4组,显微摄像系统每5 min连续记录各组细胞移行的变化图像,观察细胞在直流电场中的移行趋势;细胞免疫荧光法观察4组细胞内Integrin  $\beta$ 1位置的变化,Western blot检测各组细胞中Integrin  $\beta$ 1下游的p-FAK及p-ERK的表达量变化。结果 暴露于直流电场中的细胞胞体形态由扁平形逐渐转变为垂直于电场的纺锤形,观察期间细胞呈现朝阴极定向移行,而未暴露于直流电场的细胞则未发生胞体形态改变及定向移行运动。细胞免疫荧光示在直流电场中A549细胞膜表面上的Integrin  $\beta$ 1向阴极方向边集,Western blot结果显示Integrin  $\beta$ 1下游信号转导通路中p-FAK及p-ERK的表达量增多。结论 人肺癌细胞系A549细胞具有趋电性,体外直流电场可诱导其朝阴极定向移行,Integrin  $\beta$ 1在电场中定向重排并激活其通路下游转导信号可能在肺癌细胞趋电移行中起关键作用。

**【关键词】** 肺肿瘤 直流电场 细胞移行 趋电性

**【中图分类号】** R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2008.02.028

### The Effect of dcEFs on migration behavior of A549 cells and Integrin $\beta$ 1 expression

YAN Xiaolong\*, HAN Jing, ZHANG Zhipei, WANG Jian, NI Yunfeng, GAO Kunxiang, WANG Yunjie

\*Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xian, Shanxi 710038, China

Corresponding author: WANG Yunjie, E-mail: yjwmd@yahoo.com

**【Abstract】** Background and objective The effect of direct-current electric fields (dcEFs) on cells attracted extensive attention. Moreover the metastasis and its potential are considered to be related to dcEFs. The aim is to study the effect of dcEFs on migration behavior of A549 cells, Integrin  $\beta$ 1 and its signal pathways. **Methods** According to exposure to 5 V/cm dcEFs or not and the time of exposure, the A549 cells were divided into 4 groups. Images were taken per 5 min within 2 h to recode the migration of the cells. The data of results were analyzed statistically. **Results** Most of A549 cells exposed to the dcEFs aligned and elongated perpendicularly to the electric field lines and migrated to the cathode continually during 2 h. On the contrary, cells unexposed to dcEFs showed slightly random movements. Immunofluorescence showed that Integrin  $\beta$ 1 on plasma membrane polarized to the cathode of the dcEFs. Western blot showed that Integrin  $\beta$ 1 downstream signal pathways p-FAK and p-ERK were overexpressed in the dcEFs. **Conclusion** A549 cells have a galvanotactic feature of cathodal directed migration while exposed to the dcEFs. The polarization of Integrin  $\beta$ 1 and the promotion of its downstream signal pathways may play an important roles in the galvanotaxis of A549 cells.

**【Key words】** Lung neoplasms Direct-current electric fields Cell migration Galvanotaxis

This study was partly supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (to Hui Yannian and Han Jing) (No.30670510).

本研究受国家自然科学基金(No.30670510)资助

作者单位: 710038 西安, 第四军医大学唐都医院胸外科(闫小龙, 张志培, 汪健, 倪云峰, 高坤祥, 王云杰); 710032 第四军医大学西京医院眼科陕西(韩静)(通讯作者: 王云杰, E-mail: yjwmd@yahoo.com)

多种细胞具有在电场中定向移行的特性,即趋电性(galvanotaxis),其在胚胎发育、创伤的愈合及组织再生中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。已有实验证明鼠前列腺癌细胞的转移及转移能力可能与趋电性有关<sup>[2]</sup>,但目前尚未见有关体外直流电场(direct-current Electric fields, dcEFs)作用于肺癌细胞的报道。整合素 $\beta 1$ (Integrin $\beta 1$ )是一类重要的细胞表面受体,可诱导细胞骨架的重排,又双向传导细胞内外的信号,从而广泛影响细胞的存活、生长、分化、侵袭和转移等生物学行为<sup>[3]</sup>。本研究观察了在体外dcEFs条件下人肺癌细胞系A549细胞的趋电性,以及dcEFs对肺癌细胞Integrin  $\beta 1$ 及其信号通路的影响,探讨肺癌细胞趋电性的发生机制。

## 1 材料和方法

**1.1 试剂与仪器** 人肺癌细胞系A549购于美国ATCC,改良依格培养液DMEM、新生小牛血清(美国Hyclone公司),胰蛋白酶(美国GIBCO公司),Integrin  $\beta 1$ 、p-FAK、p-ERK及 $\beta$ -actin鼠单克隆抗体(美国SantaCruz公司),HRP标记的山羊抗鼠IgG(北京中杉公司),化学发光剂ECL(美国SantaCruz公司),直流稳压电源(北京六一仪器厂),相差生物倒置显微镜Axiovert 25(德国Zeiss公司),Axiovert计算机程像系统(德国Zeiss公司),荧光系统(美国Alpha Innotech公司)。

**1.2 细胞培养** 人肺癌细胞系A549复苏后,细胞在5%CO<sub>2</sub>、37℃细胞培养箱中,以DMEM为培养基,其中加入10%小牛血清,100 U/mL青霉素,100  $\mu$ g/mL链霉素。当细胞铺满80%培养瓶底面时,0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,以(1-2)  $\times 10^5$ /mL密度接种于I号盖玻片(0.18 mm  $\times$  10 mm  $\times$  24 mm)上,细胞培养箱中孵育24 h-48 h。

**1.3 电场制备外加的直流电场设备** 参照ZHAO Min等方法<sup>[4]</sup>。用硅酮胶将两片平行放置、厚0.5 mm、长24 mm、间距10 mm的有机玻璃片固定于培养皿底部;其间放入接种有A549细胞的I号盖玻片,随即于上方覆盖II号盖玻片(24 mm  $\times$  14 mm);硅酮胶密封,即形成一端开放的细胞培养小室,维度为10 mm  $\times$  24 mm  $\times$  0.5 mm。小室两端分别与10 mm  $\times$  30 mm  $\times$  5 mm的玻璃槽连接,以增加培养液容积而防止其PH值产生明显波动。向槽中加入培养液,使其刚好流过细胞培养小室中的细胞表面。两根Pt电极置于盛有生理盐水的烧杯中,用两根盐桥管分别将细胞培养小室两端的培养液

与烧杯相连,以防止电解产物进入培养液(图1)。实验过程中维持电流低于0.6 mA而减少焦耳热。监测小室两端电压。控制细胞周围环境于37℃,5%CO<sub>2</sub>。

**1.4 dcEFs对肺癌A549细胞的作用** 按A549肺癌细胞是否暴露于直流电场及暴露时间分为A, B, C, D 4组, A组为对照组, B组给予强度为5 V/cm的体外直流电场刺激1 h, C组给予强度为5 V/cm的体外直流电场刺激2 h, D组给予与C组相同的刺激后再培养2 h。其余各组条件相同。每组重复实验3次,每组每次观察在同一个400倍观察视野下细胞数为10-20个左右。标记每个观察细胞核的中心并追踪其位移(双核及多核细胞标记其几何中心),参数参照Korohodot等方法<sup>[5]</sup>,包括观察细胞平均位移距离(Average total length of cell displacement, ATLD),平均位移速度(Average rate of cell displacement, ARD)及平均移行方向 $\Sigma_N \cos \gamma / N$ ,  $\cos \gamma$ 为所有单个细胞观察时间内位移方向指标。 $\gamma$ 是观察期间相继时间点细胞移动位置连线与场线间的夹角。阴极方向, $\gamma = 0^\circ$ ,  $\cos \gamma = 1$ ; 阳极方向, $\gamma = 180^\circ$ ,  $\cos \gamma = -1$ , 故 $\cos \gamma$ 是-1与1之间的值。

**1.5 Integrin  $\beta 1$ 的间接免疫荧光染色** 每组细胞经4%的多聚甲醛固定30 min,于-20℃经100%甲醇打孔5 min, PBS清洗3次, 5 min/次, 10%羊血清封闭30 min后加鼠源单抗Integrin  $\beta 1$ (稀释度为1:50)过夜, PBS清洗3次, 5 min/次, 加入FITC标记的二抗IgG(稀释度为1:50), 37℃暗室中放置1 h, PBS清洗3次, 50%甘油封片后镜检,以PBS代替一抗作为阴性对照。实验均重复三次。

**1.6 Western blot分析各组细胞p-FAK及p-Akt的蛋白表达** 用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液于4℃裂解细胞, 12000 rpm低温离心,取上清,BCA法测定蛋白浓度后,

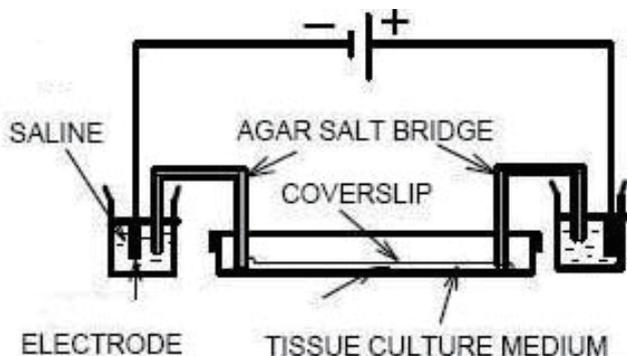


图1 电场结构示意图

Fig 1 construction of the electric field instrument used in this experiment

取50 μg蛋白, 95 °C变性5 min, 8% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿转至硝酸纤维素膜。5%脱脂奶室温封闭2 h, 加封闭液稀释的一抗于4 °C过夜。HRP标记的山羊抗鼠IgG室温反应1 h, 化学发光剂ECL反应, X线胶片曝光, 冲洗晾干后扫描蛋白条带。以β-actin为内参照。用凝胶成像分析系统进行定量分析。实验均重复三次。

1.7 数据整理及统计学分析 采用Image-Pro Plus5.0进行数据收集, SAS 8.0统计软件处理数据, 并行两独立样本比较的Wilcoxon秩和检验进行分析。

## 2 结果

2.1 肺癌A549细胞在电场中定向移行 未暴露于5 V/cm直流电场的A组细胞无明显移动, 细胞的板状伪足形态各异, 在细胞周围随机分布。暴露于直流电场B, C组的多数细胞伪足伸向阴极方向, 且出现朝电场阴极定向移行(图2), 同时A549细胞胞体形态由扁平形逐渐转变为垂直于电场的纺锤形(图2B, C), 解除直流电场干预2 h内, 细胞不再朝向电场阴极定向移行并逐渐恢复扁平形态(图2D)。B、C组暴露于直流电场的细胞TLD及Σ<sub>N</sub>cosine γ/N与对照组比较存在统计学差异( $P_{TLD}=0.001, P_{\Sigma N \cos \gamma / N}=0.001$ ), B与C组的细胞比较ARD及Σ<sub>N</sub>cosine γ/N均无统计学差异( $P>0.05$ ) (表1), 解除电场的干预后的D组细胞不再呈现定向移行的趋势, 其ARD及Σ<sub>N</sub>cosine γ/N与A组比较均无统计学差异( $P>0.05$ ), 与B、C组比较均存在统计学差异( $P_{TLD}=0.001, P_{\Sigma N \cos \gamma / N}=0.002$ ) (表1)。

2.2 整合素Integrin β1的定向重排 Integrin β1在细胞内主要存在于细胞核周及细胞膜上, 未施加电场干预组Integrin β1在各细胞膜上随机分布, 无方向一致性, 而施加5 V/cm电场干预组Integrin β1在各细胞膜上重新排列, 且朝向阴极(图3)。

2.3 体外直流电场对人肺癌A549细胞p-FAK及p-Akt表达的影响 人肺癌A549细胞在5 V/cm中电场暴露后, p-FAK及p-Akt蛋白表达水平均明显升高, 这种变化在暴露于电场中1h内即达到稳定, 在2 h时未见增强及减弱, 解除电场的干预后2 h p-FAK及p-Akt蛋白表达水平下降但仍比加电前高(图4)。

## 3 讨论

肿瘤细胞移行是一个复杂过程, 受许多因素共同影响。如细胞外基质成分、多种生长因子、肿瘤源性的自分泌因子, 趋化性细胞因子, 以及信号转导通路等等<sup>[6]</sup>, 肿瘤细胞的移行能力与肿瘤的转移潜能有关, 在转移过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>, 大量研究证明肿瘤细胞可以在多种趋化性细胞因子的作用下定向移行, 且与肿瘤的转移有关, 而关于肿瘤的趋电性研究还只处于起始阶段<sup>[8]</sup>。

已证明, 体内由上皮覆盖的正常组织表面存在着跨上皮电势 (transepithelial potential, TEP)<sup>[9]</sup>, 气管及支气管的粘膜上皮均存在着跨上皮电势, 其大小约为10.6-13.4 mV<sup>[10]</sup>, 当细胞层出现缺损, 或细胞间紧密连接阻力降低时, TEP便驱使带电离子流动, 形成内源性电场, 其大小相当于体外直流电场~5 V/cm<sup>2</sup>。肿瘤细胞突破上皮组织后便会受到内生电场的影响, 然而, 肿瘤细胞趋电性和转移的关系及其机制目前尚不清楚。

为了解肺癌细胞的趋电性, 设计、利用体外直流电场作用于A549肺癌细胞, 观察直流电场对肺癌细胞的影响。实验发现多数肺癌细胞在5 V/cm电场中出现两种变化, 即形态及移行的变化。细胞由扁平的上皮型细胞转变成纺锤形, 即细胞的间叶样形态改变。已有实验证实某些蛋白激酶也可以诱导这种形态改变, 并证明“上皮细胞-间叶样变”可以视为细胞侵袭的一种标志, 有利于肿瘤细胞的浸润和转移<sup>[11]</sup>。同时发现肺癌

表 1 不同组A549细胞在直流电场中的移行指标(Mean±SD)

Tab 1 Parameters of migration of different group A549 cells in dcEFs(Mean±SD)

	Group A (n=43, 0 v, 2 h)	Group B (n=55, 5 v, 1 h)	Group C (n=39, 5 v, 2 h)	Group D (after: 5 v, 2 h) (n=51, 0 v, 2 h)
ATLD(μm)	-1.2±0.2	25.0±6.3	46.0±11.5	2.1±0.6
ARD(μm/h)	-0.6±0.1	25.0±6.3	23.0±5.7 <sup>*</sup>	1.5±0.3 <sup>‡</sup>
Σ <sub>N</sub> cos γ/N	-0.03±0.01	0.76±0.08	0.78±0.09 <sup>§</sup>	0.06±0.02 <sup>^</sup>

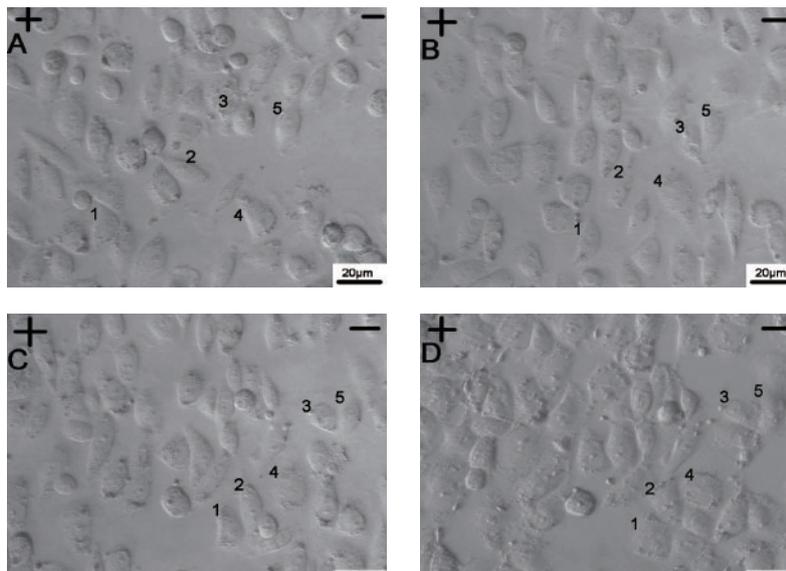


图 2 A549细胞在电场中的定向移行及形态变化

Fig 2 Directional migration and morphology changes of A549 cells in dcEFs

A: Control group (0 h); B: Exposed to dcEFs (1 h); C: Exposed to dcEFs (2 h); D: After exposed to dcEFs for 2 h, unexposed to dcEFs for 2 h. Numbers of 1, 2, 3, 4 and 5 represent the corresponding cells positions in different time. (bar=20 µm)

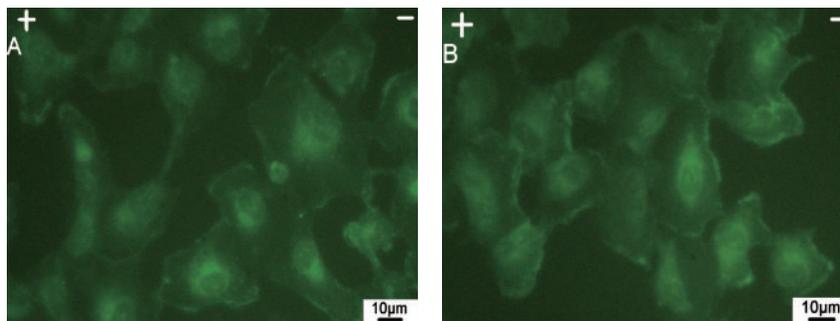


图 3 A549细胞在体外5 V/cm的直流电场中暴露前后Integrin β1的分布情况。

Fig 3 The distribution of Integrin β1 in plasma membrane of A549 cells before or after exposed to dcEFs

A: Control group (0 h), no cathodal polarization of Integrin β1 in plasma membrane; B: Exposed to dcEFs (2 h), cathodal polarization of Integrin β1 in plasma membrane (bar=10 µm)

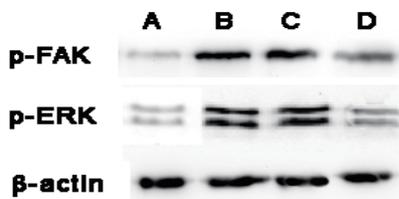


图 4 A549细胞在体外5 V/cm的直流电场中暴露前后p-FAK及p-ERK的表达情况。

Fig 4 The expression of p-FAK and p-ERK of A549 cells before or after exposed to dcEFs

A: Control group (0 h); B: Exposed to dcEFs (1 h);

C: Exposed to dcEFs (2 h);

D: Exposed to dcEFs for 2 h, then unexposed to dcEFs for 2 h

A549细胞暴露于外加直流电场中, 其移行能力明显加强, 且朝阴极作定向移行; 在5 V/cm大小的直流电场中其速度均为25 µm/h, 其移行的速度相对恒定, 在2 h内未见其移行速度的明显改变, 而在解除电场作用后细胞不再定向移行, 说明通过干扰内生电场有可能会减小肺癌细胞转移的几率。

整合素Integrin β1的间接免疫荧光染色提示: 在5 V/cm大小的直流电场的作用下, A549肺癌细胞膜表面的Integrin β1集中于电场的阴极方向, Integrin β1被激活可能是细胞朝向阴极移行的原因之一。Western blot结果显示, 在电场作用下整合素下游信号传导通路FAK及ERK被激活, 它们相应的磷酸化形式p-FAK及

p-ERK表达明显升高,此现象可能是A549肺癌细胞在电场中移行速度加快的原因。

#### 参 考 文 献

- 1 McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, et al. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. *Physiol Rev*, 2005, 85(3): 943-978.
- 2 Djamgoz MBA, Mycielska M, Madeja Z, et al. Directional movement of rat rostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltagegated Na<sup>+</sup> channel activity. *J Cell Sci*, 2001, 114(14): 2697-2705.
- 3 Brakebusch C, Fassler R. beta 1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more. *Cancer Metastasis Rev*, 2005, 24(3): 403-411.
- 4 Zhao M, Agius-Fernandez A, Forrester JV, et al. Orientation and directed migration of cultured corneal epithelial cells in small electric fields are serum dependent. *J Cell Sci*, 1996, 109 ( Pt 6):1405-1414.
- 5 Korohoda W, Mycielska M, Janda E, et al. Immediate and long-term galvanotactic responses of Amoeba proteus to dc electric fields. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2000, 45(1): 10-26.
- 6 Levine MD, Liotta LA, Stracke ML. Stimulation and regulation of tumor cell motility in invasion and metastasis. *EXS*, 1995, 74(3): 157-179.
- 7 Partin AW, Schoeniger JS, Mohler JL, et al. Fourier analysis of cell motility: correlation of motility with metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(4): 1254-1258.
- 8 Mycielska ME, Djamgoz MB. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 9): 1631 - 1639 .
- 9 Nuccitelli R. A role for endogenous electric fields in wound healing. *Curr Top Dev Biol*, 2003, 58 (1): 1-26.
- 10 Fajac I, Lacroque J, Lockhart A, et al. Silver/silver chloride electrodes for measurement of potential difference in human bronchi. *Thorax*, 1998, 53(10): 879-881.
- 11 Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, et al. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 172-2178.

(收稿: 2007-10-29 修回: 2008-03-18)

(本文编辑 孙丹)

## · 启 事 ·

### 《中国肺癌杂志》(Chinese Journal of Lung Cancer)成为URM缔约期刊

2008年1月8日,经过《中国肺癌杂志》的申请,得到国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE)通知,本刊于该日成为“生物医学期刊投稿的统一要求”(Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, URM)的缔约期刊(<http://www.icmje.org/jrnlist.html>)。这标志着《中国肺癌杂志》经过10年发展,已经全面按照国际期刊标准来办刊,以期早日成为世界知名期刊。

关于ICMJE和“生物医学期刊投稿的统一要求”:1978年,包括《新英格兰医学杂志》、《美国医学会杂志》、《柳叶刀》、《英国医学杂志》等综合性英文医学期刊的编辑在加拿大大不列颠哥伦比亚温哥华市非正式制定了向这些编辑所在期刊投稿格式的统一要求。后来该小组以温哥华小组(Vancouver Group)而闻名于世。温哥华小组制定的第1版“生物医学期刊投稿的统一要求”,包括美国国立医学图书馆提供的参考文献著录格式(又称温哥华格式, Vancouver Style)于1979年发表。温哥华小组经不断扩大,逐渐发展成为国际医学期刊编辑委员会(ICMJE),该委员会每年召开会议,不断将委员会所关注的问题增补进“统一要求”中,2007年10月编制了最新版“生物医学期刊投稿的统一要求”(<http://www.icmje.org/icmje.pdf>)。“生物医学期刊投稿的统一要求”对生物医学出版物的文章书写和杂志编辑两个方面进行统一的规范和指导,该要求内容包括:署名作者的标准及其与致谢中的有贡献者的区别;编辑的角色和编辑自由;作者、项目资助者、文章评论者及编辑者之间潜在的利益冲突;保密问题;研究中对人 and 动物的保护;杂志编辑和出版的有关问题;论文准备和投稿,等等。该要求发布在<http://www.ICMJE.org>网站上,并且定期进行更新。国外许多著名生物医学期刊都采用或参考了这个要求。目前,同意“统一要求”的英文生物医学期刊已超过500种。“统一要求”已成为这500多种生物医学期刊共同遵守的投稿须知(尽管几乎所有生物医学期刊均刊登各自特有的投稿须知)。