

## 电场对内皮祖细胞迁移行为及形态的影响

胡雪飞<sup>1</sup>,程 勇<sup>2</sup>,文 星<sup>1</sup>,王永飞<sup>1</sup>,王 强<sup>2</sup>,许喜生<sup>1△</sup>

(1. 南华大学附属郴州市第一人民医院烧伤整形科,湖南郴州 423000;

2. 广东省清远市人民医院烧伤整形科 511500)

**[摘要]** **目的** 探讨外加电场对体外培养的内皮祖细胞(EPCs)迁移行为及形态的影响。**方法** 将体外培养的 3~4 代 EPCs 分别用场强为 0 mV/mm(I 组)、100 mV/mm(II 组)、200 mV/mm(III 组)和 300 mV/mm(IV 组)的直流电场加以持续刺激 3 h,活细胞工作站实时记录细胞迁移轨迹及形态变化,分析外加电场对 EPCs 迁移行为及形态的影响。**结果** IV、III、II 组细胞向阳极定向迁移,I 组细胞显示随机运动。电刺激 3 h 时,细胞轨迹迁移速率(Vt)、位移速率(Vd)、电场方向迁移速率(Vx)分别为:IV 组[(98.86±6.00)、(63.78±2.81)、(63.15±2.88)μm/h]、III 组[(88.06±8.83)、(35.90±1.22)、(34.20±1.57)μm/h]和 II 组[(42.28±2.25)、(13.29±0.37)、(12.39±0.51)μm/h],均显著高于 I 组的[(37.39±2.42)、(6.99±0.31)、(4.62±0.40)μm/h],均  $P<0.01$ ,且 III 组细胞 Vt、Vd、Vx 均显著高于 II 组、I 组(均  $P<0.01$ )。EPCs 在电场刺激下发生明显的形态变化,细胞外观变得狭长,逐渐与电场方向平行排列。**结论** 外加直流电场可诱导 EPCs 向阳极迁移并加快其迁移速率,且对 EPCs 的形态有明显影响。

**[关键词]** 电场;内皮祖细胞;趋电性;细胞迁移

**[中图分类号]** R622

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)10-1316-04

### Influence of electric fields on migration behavior and morphology of endothelial progenitor cells

Hu Xuefei<sup>1</sup>, Cheng Yong<sup>2</sup>, Wen Xing<sup>1</sup>, Wang Yongfei<sup>1</sup>, Wang Qiang<sup>2</sup>, Xu Xisheng<sup>1△</sup>

(1. Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Chenzhou Municipal First People's Hospital, University of South China, Chenzhou, Hunan 423000, China; 2. Department of Burns and Plastic Surgery,

People's Hospital of Qingyuan, Qingyuan, Guangdong 511500, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the influence of external electric fields on migration behavior and morphology of endothelial progenitor cells (EPCs) cultured in vitro. **Methods** The in vitro cultured 3-4 generation EPCs were continuously stimulated by direct-current electric field with the field intensity of 0 mV/mm(group I), 100 mV/mm(group II), 200 mV/mm(group III) and 300 mV/mm(group IV) for 3 h. The live cell station was used to real time record the cell migration track and morphology change of EPCs. The influence of external electric field on the EPCs migration behavior and morphology was analyzed. **Results** Under the stimulation of the direct-current electric field with the intensity of group IV, group III and group II, the cells were directly migrated to anode, while the cells under group I displayed the random motion. The track migration velocity(Vt), displacement velocity(Vd) and electric field direction migration rate(Vx) were (98.86±6.00), (63.78±2.81), (63.15±2.88)μm/h for the group IV, (88.06±8.83), (35.90±1.22), (34.20±1.57)μm/h for the group III, (42.28±2.25), (13.29±0.37), (12.39±0.51)μm/h for the group II, which were significantly higher than (37.39±2.42), (6.99±0.31), (4.62±0.40)μm/h for the group I ( $P<0.01$ ), moreover Vt, Vd and Vx in the group III were significantly higher than those in the group II and I ( $P<0.01$ ). EPCs had obvious morphological changes under the electric field action, such as elongation and the cellular long axis parallel to the electric field direction. **Conclusion** External direct current electric fields may induce the directed migration of EPCs towards the anode, accelerates the migration rate, moreover has obvious influence on EPCs morphology.

**[Key words]** electric fields; endothelial progenitor cells; galvanotaxis; cell migration

内源性生物电场(endogenous electric fields)对机体损伤愈合及功能恢复具有重要作用,使用药物或外加极性相反的电场消除内源性电场可阻碍上述进程,而增强该内源性电场可加快病变部位愈合速度和改善愈合质量<sup>[1-2]</sup>。血管修复作为损伤修复的重要分支,探寻促进血管修复的方法已被众多科研工作者关注。已有研究表明,电刺激通过影响内皮细胞的生物学特性,对血管修复起着重要的积极作用<sup>[3]</sup>。然而,内皮细胞作为终末分化类型的细胞,其对血管重建的作用十分有限<sup>[4]</sup>,这也限制了电刺激在血管修复方面的研究。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)作为血管内皮细胞的前体细胞,可

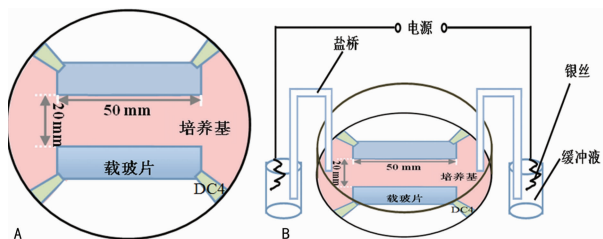
在缺血、缺氧等诱导下向病损部位归巢<sup>[5]</sup>,对于血管修复与形成的实现更有应用价值。指导 EPCs 定向迁移对于促进血管损伤修复与创面愈合具有重要临床意义,因此,本研究观察了外加电场对体外培养的 EPCs 生物学行为的影响,为电刺激促进血管修复的研究提供理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物、主要试剂与仪器来源** 清洁级同种系雌性 C57B/6J 小鼠,6~8 周龄,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司,美国),胎牛血清(Gibco 公司,澳大利亚),小鼠单个核细胞

分离液(密度 1.090,天津灏洋生物制品科技有限公司,中国),胰蛋白酶、EDTA(Biosharp 公司,中国),FITC 标记的荆豆类凝集素(FITC-UEA,Sigma 公司,美国),DiI-乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acLDL,Molecular Probe 公司);CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo Forma 公司,美国),倒置显微镜(Olympus 公司,日本),活细胞工作站(Applied Precision 公司,美国),Imaries 6.5 软件(Bitplane 公司,瑞士)。

**1.2 电场刺激装置细胞培养小室的制备** 直流电场模拟生理电场干预装置参照 Song 等<sup>[6]</sup>的方法进行改良制作,原理图见图 1。制作简述如下:使用康道宁绝缘硅脂硅基复合物 4(DC4)将盖玻片(50.00 mm×12.00 mm×0.15 mm)比照图纸(图 1A)粘贴至培养皿(直径 10 cm)内,使其与培养皿底面紧密接触,再用 DC4 将密封条和培养皿内缘连接,阻断培养基自由流动,即制作成趋电小室,密封条间形成 50.00 mm×20.00 mm×0.15 mm 的区域维度用于接种细胞,该区域可使场强和电流均匀分布。再将其与盐桥、Steinberg 缓冲液、银丝、电线、输出电源构成完整的趋电装置(图 1B)。



A:趋电小室示意图;B:内源性生物电场模拟趋电装置示意图。

图 1 内源性生物电场模拟装置

**1.3 方法**

**1.3.1 EPCs 的分离、培养及鉴定** 具体方法参照文献<sup>[7]</sup>。

**1.3.2 电场刺激** 将 3~4 代骨髓来源小鼠 EPCs 均匀接种于趋电小室,培养 24 h 后,更换培养基,分别用强度为 100 mV/mm(II 组)、200 mV/mm(III 组)和 300 mV/mm(IV 组)的电场连续电刺激 3 h,活细胞工作站实时记录电场刺激下细胞迁移轨迹及形态,0 mV/mm 组(I 组)细胞作为对照。

**1.3.3 EPCs 迁移能力及形态测定** EPCs 迁移能力:采用 Imaries 6.5 软件量化细胞迁移能力<sup>[8]</sup>,用细胞迁移方向、轨迹迁移速率(V<sub>t</sub>)、位移速率(V<sub>d</sub>)、电场方向迁移速率(V<sub>x</sub>)表示, V<sub>t</sub>=T<sub>t</sub>/T, V<sub>d</sub>=T<sub>d</sub>/T, V<sub>x</sub>=D<sub>x</sub>/T, 迁移方向用 cosθ 表示,  $\cos\theta = \frac{\sum_{i=1}^n \cos \theta_i}{n}$ , 该值接近 0 表示细胞随机运动,接近 -1 表示细胞向阳极迁移,接近 1 表示细胞向阴极迁移。其中,θ 表示细胞位移方向与电场方向之间的夹角,T<sub>t</sub> 表示细胞迁移轨迹总长度,T<sub>d</sub> 表示位移,D<sub>x</sub> 表示细胞沿电场方向运动的距离,T 表示电刺激时间,i 代表单个细胞,n 表示细胞总数,见图 2。EPCs 形态测定:采用 soft WoRx Explorer 软件测定细胞长短轴比值量化细胞形态。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件统计,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数比较采用重复测量方差分析及单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 EPCs 鉴定** 细胞形态学鉴定:分别于接种后 0、1、3、7、14 d 在相差显微镜下观察细胞形态学特征,原代 EPCs 培养约 48 h 开始贴壁,3 d 后换液可见贴壁细胞呈圆形、短梭形或多

角形,7 d 时克隆上基本无圆形细胞附壁,10~15 d 细胞约 70% 融合,局部密集区呈铺路石样排列。双吞实验鉴定细胞表型:通过荧光显微镜鉴定发现,同时摄取 DiI-acLDL 和 FITC-UEA 的双阳性细胞的比例达 90%,表明贴壁细胞为正在分化的 EPCs。

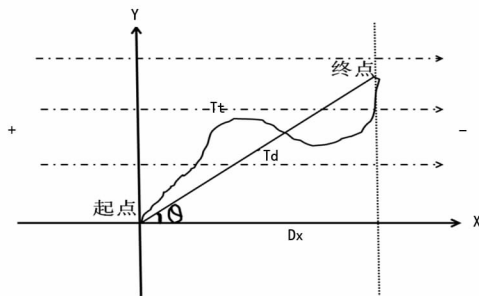


图 2 细胞迁移方向及速率的量化方法示意图

**2.2 电场下 EPCs 迁移能力检测** I 组 EPCs 迁移方向是随机的(图 3A、B、E);II、III、IV 组 EPCs 向阳极定向迁移,且细胞逐渐变得狭长,细胞长轴逐渐与电场方向平行(图 3C、D、F)。细胞定向迁移能力与场强呈正相关(图 3G),场强越大,cosθ 值越大,定向迁移越明显,II、III、IV 组 cosθ 值均较 I 组大,IV 组 cosθ 值亦均较 III 组、II 组大(P<0.01),见表 1。EPCs 迁移速率 V<sub>t</sub>、V<sub>d</sub>、V<sub>x</sub> 均与场强呈正相关(图 3H),与 I 组比较,II、III、IV 组 V<sub>t</sub>、V<sub>d</sub>、V<sub>x</sub> 均明显升高(P<0.01);III 组 V<sub>t</sub>、V<sub>d</sub>、V<sub>x</sub> 均高于 II 组(P<0.01),IV 组细胞 V<sub>t</sub>、V<sub>d</sub>、V<sub>x</sub> 均显著高于 III 组和 II 组(P<0.01),见表 2。EPCs 受电场刺激后,细胞出现伸长反应,其外观呈狭长梭形,逐渐与电场方向平行排列,见图 3C、D。其细胞长短轴比值在 IV 组电场中 1、2、3 h 分别为 2.966±0.059、4.183±0.068 和 6.243±0.098,与 I 组 0 h 时细胞比值(2.219±0.084)相比明显增加(均 P<0.01)。

表 1 4 组 EPCs 各时相点 cosθ 值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	1 h	2 h	3 h
I 组	3	0.024±0.039	0.020±0.074	-0.038±0.054
II 组	3	-0.586±0.049 <sup>a</sup>	-0.728±0.027 <sup>a</sup>	-0.847±0.027 <sup>a</sup>
III 组	3	-0.807±0.086 <sup>ab</sup>	-0.911±0.035 <sup>ab</sup>	-0.944±0.015 <sup>ab</sup>
IV 组	3	-0.968±0.008 <sup>abc</sup>	-0.984±0.004 <sup>abc</sup>	-0.989±0.003 <sup>abc</sup>
F		350.130	456.378	458.433
P		0.000	0.000	0.000

<sup>a</sup>:P<0.01,与 I 组比较;<sup>b</sup>:P<0.01,与 II 组比较;<sup>c</sup>:P<0.01,与 III 组比较。

表 2 4 组 EPCs 迁移速率的比较( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}/\text{h}$ )

组别	n	V <sub>t</sub>	V <sub>d</sub>	V <sub>x</sub>
I 组	3	37.39±2.42	6.99±0.31	4.62±0.40
II 组	3	42.28±2.25 <sup>a</sup>	13.29±0.37 <sup>a</sup>	12.39±0.51 <sup>a</sup>
III 组	3	88.06±8.83 <sup>ab</sup>	35.90±1.22 <sup>ab</sup>	34.20±1.57 <sup>ab</sup>
IV 组	3	98.86±6.00 <sup>abc</sup>	63.78±2.81 <sup>abc</sup>	63.15±2.88 <sup>abc</sup>
F		629.898	917.064	953.307
P		0.000	0.000	0.000

<sup>a</sup>:P<0.01,与 I 组比较;<sup>b</sup>:P<0.01,与 II 组比较;<sup>c</sup>:P<0.01,与 III 组比较。

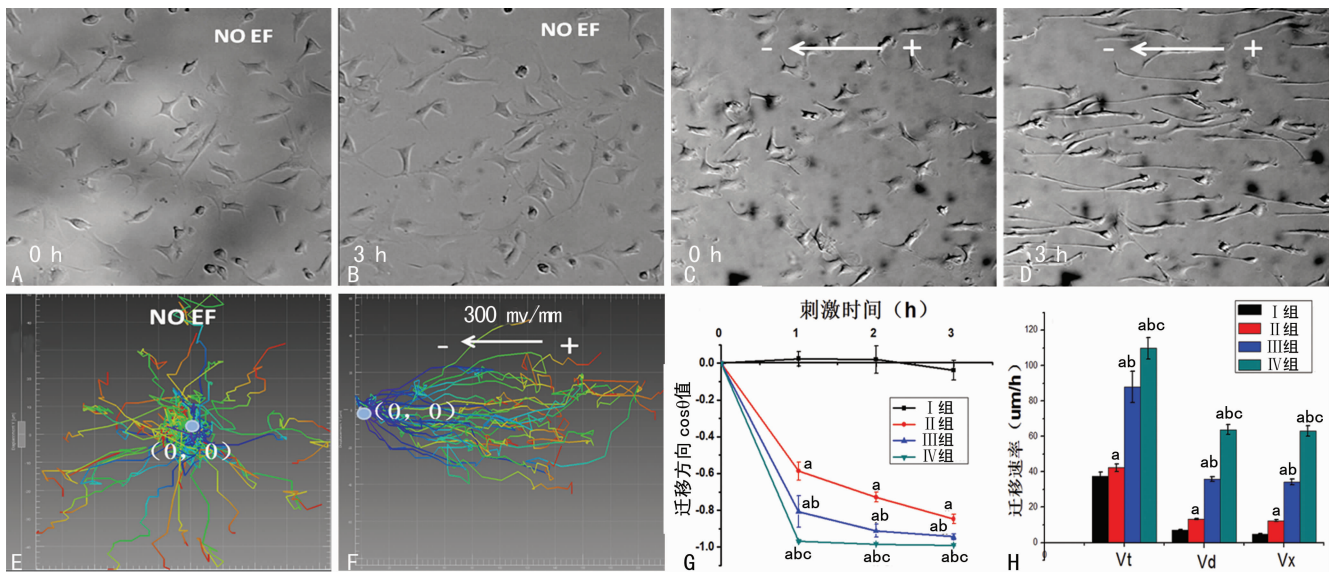


图3 电场作用下EPCs的迁移  
A、B、E:无电场时EPCs前后3h的形态及迁移轨迹;C、D、F:电场下EPCs前后3h的形态及迁移轨迹,原点(0,0)为细胞运动的起点;G:不同场强下及各时间点细胞的 $\cos\theta$ 值;H:不同场强作用3h时细胞的平均移行速率;<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与I组比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与II组比较;<sup>c</sup>: $P<0.01$ ,与III组比较。

图3 电场作用下EPCs的迁移

### 3 讨论

生物电现象普遍存在于生命体内,胚胎发育、组织再生、创面愈合等都需要生物电的参与。细胞膜两侧正负离子的流动产生跨细胞电势差,当机体组织细胞因生理或病理因素产生结构改变时,原有电势差改变,产生内源性电场<sup>[9]</sup>。大量实验数据表明,通过外加一定强度的电场增强内生电场,可加快病变部位愈合速度和改善愈合质量<sup>[1-2,10-11]</sup>。血管乃全身的命脉系统,机体的各种创伤、缺血损伤无不伴随血管的损伤,同时也伴随生物电的改变。因此,通过外加电场调整病灶部位内生物电场进行血管修复不失为一种有效的方法。目前,电刺激在血管修复方面的研究已取得了不少成绩,其研究的对象主要是血管内皮细胞,电刺激可能通过作用于内皮细胞来调控血管生成<sup>[12]</sup>。通过对血管内皮细胞电刺激研究发现,适宜的电刺激强度可促进血管再生与修复。然而,血管内皮细胞作为终末分化类型的细胞,其迁移、增殖能力十分有限,不能满足血管修复与再生的需要;EPCs作为血管内皮细胞的前体细胞,其强大的增殖分化潜能已被众多科学家所关注<sup>[13]</sup>。EPCs存在于骨髓和外周血中,可向损伤部位迁移或归巢<sup>[14]</sup>。许多因素调控着EPCs向损伤血管或血管生成部位归巢,具体机制尚不清楚。趋化因子和细胞因子,如血管内皮生长因子等,影响EPCs的数量和迁移<sup>[14-15]</sup>。发展促进EPCs迁移的有效方法及对EPCs向损伤和血管形成部位归巢具体机制的认识具有重要临床意义。

本研究通过建立外源性电刺激装置模拟内源性生物电场,探讨电刺激下EPCs迁移行为的改变。研究结果显示,EPCs可在外源性电场的刺激下向阳极定向迁移,场强越大,定向迁移越明显,而对照组迁移方向随机;各电刺激组细胞的迁移速率均较对照组显著增强,且迁移速率随电场刺激强度的增强而加快;各电刺激组细胞形态变得狭长,其长轴与电场方向平行,且场强越大,狭长形态越明显,而对照组形态变化不明显。提示内源性生物电场具有促进EPCs向阳极定向迁移的能力并

能提高迁移速率,并能改变细胞形态。此外,本实验还发现EPCs不能耐受大于300 mV/mm的电场强度,350 mV/mm的场强对其进行刺激时,即开始出现部分EPCs死亡的现象。提示本实验条件下,300 mV/mm的场强刺激时,EPCs定向迁移最明显,迁移速率最快,同时细胞可以耐受。因此,在本实验中,300 mV/mm的场强为促进EPCs迁移的最佳电场强度。

综上所述,本实验结果提示电刺激能够诱导体外培养的EPCs向阳极定向迁移,且迁移速率与一定范围内的场强强度呈正相关,300 mV/mm的场强为促进EPCs迁移的最佳电场强度;EPCs在电场下形态逐渐变得狭长,其细胞长轴与电场方向平行。产生此种现象的具体机制尚不明确。细胞迁移是血管新生的前提,电场促进EPCs定向迁移有望促进血管生成。电刺激下EPCs生物学特性改变的研究促进了电刺激促进血管新生的相关研究,最终可为电刺激在血管损伤如缺血、创伤等病变中的应用提供新的理论依据,同时也可为其他治疗方法中EPCs的应用提供新思路。

然而,在血管生成中,电场对EPCs分化形成血管的能力是否存在影响也值得进一步研究。本实验初步探讨了电场对EPCs迁移的影响,电场是否同时存在对细胞分化能力的影响。已有研究表明,电场能够促进心肌干细胞向心肌细胞分化,促进神经干/祖细胞向神经元分化<sup>[16]</sup>,促进人胚胎干细胞向心肌细胞分化<sup>[17]</sup>,提示电场可能是促进细胞分化的重要因素。因此,电场对EPCs分化形成血管能力的影响值得进一步探索。

### 参考文献

- [1] Kloth LC. Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials[J]. Int J Low Extrem Wounds, 2005, 4(1): 23-44.
- [2] Barnes R, Shahin Y, Gohil R, et al. Electrical stimulation vs. standard care for chronic ulcer healing: a systematic

- review and meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *Eur J Clin Invest*, 2014, 44(4): 429-440.
- [3] 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]. *J Cell Sci*, 2004, 117(3): 397-405.
- [4] Kssmeyer S, Plendl J, Custodis P, et al. New insights in vascular development; vasculogenesis and endothelial progenitor cells [J]. *Anat Histol Embryol*, 2009, 38(1): 1-11.
- [5] Hristov M, Zerneck A, Liehn EA, et al. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury [J]. *Thromb Haemost*, 2007, 98(2): 274-277.
- [6] 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 [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(6): 1479-1489.
- [7] 赵晓辉, 吴楠, 尹扬光, 等. 雌二醇调控小鼠内皮祖细胞凋亡及体外血管新生研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(13): 1399-1402.
- [8] Li Li, Wei Gu, Juan Du, et al. Electric fields guide migration of epidermal stem cells and promote skin wound healing [J]. *Wound Rep Reg*, 2012, 20(6): 840-851.
- [9] McCaig CD, Rajniecek AM, Song B, et al. Has electrical growth cone guidance found its potential [J]. *Trends in Neurosciences*, 2002, 25(7): 354-359.
- [10] McCaig CD, Rajniecek AM, Song B, et al. Controlling cell behavior electrically; current views and future potential [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(3): 943-978.
- [11] Mycielska ME, Djamgoz MBA. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects; galvanotaxis and metastatic disease [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(9): 1631-1639.
- [12] Nagasaka M, Kohzuki M, Fujii T, et al. Effect of low-voltage electrical stimulation on angiogenic growth factors in ischaemic rat skeletal muscle [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33(7): 623-627.
- [13] Liew A, Barry F, O'Brien T. Endothelial progenitor cells; diagnostic and therapeutic considerations [J]. *Bioessays*, 2006, 28(3): 261-270.
- [14] Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells in vascular repair and remodeling [J]. *Pharmacol Res*, 2008, 58(2): 148-151.
- [15] Gurtner GC, Chang E. "Priming" endothelial progenitor cells a new strategy to improve cell based therapeutics [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(6): 1034-1035.
- [16] Li L, Jiang J. Stem cell niches and endogenous electric fields in tissue repair [J]. *Front Med*, 2011, 5(1): 40-44.
- [17] Serena E, Figallo E, Tandon N, et al. Electrical stimulation of human embryonic stem cells; cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(20): 3611-3619.

(收稿日期: 2015-12-18 修回日期: 2016-01-25)

(上接第 1315 页)

- and evaluation of scutellarein-O-alkylamines as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 94: 348-366.
- [5] Hruska Z, Dohanich GP. The effects of chronic estradiol treatment on working memory deficits induced by combined infusion of beta-amyloid (1-42) and ibotenic acid [J]. *Horm Behav*, 2007, 52(3): 297-306.
- [6] Lewis J, Dickson DW, Lin WL, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP [J]. *Science*, 2001, 293(5534): 1487-1491.
- [7] 杨云, 卞广兴, 吕秋军. 多靶向抗阿尔茨海默病的研究进展 [J]. *中国新药志*, 2008, 17(1): 12-20.
- [8] 张兰, 叶翠飞, 褚燕琦, 等. 二苯乙烯苷对鹅膏蕈氨酸致痴呆大鼠模型脑内胆碱能系统的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2005, 10(10): 749-752.
- [9] 陈民, 王晶, 陈欢雪.  $A\beta_{1-42}$  合并 IBO 诱导阿尔茨海默病大鼠模型的建立和评价 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2010, 8(4): 465-467.
- [10] Morimoto K, Yoshimi K, Tonohiro T, et al. Co-injection of beta-amyloid with ibotenic acid induces synergistic loss of rat hippocampal neurons [J]. *Neuroscience*, 1998, 84(2): 479-487.
- [11] Lean JM, Davies JT, Fuller K, et al. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(6): 915-923.
- [12] 卢继承, 林贞贤. 白藜芦醇对  $A\beta$  致大鼠学习记忆损伤的修复作用 [J]. *泰山学院学报*, 2013, 35(3): 120-123.
- [13] Fukui H, Moraes CT. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection; reality or just an attractive hypothesis [J]. *Trends Neurosci*, 2008, 31: 251-256.
- [14] Cohen S, Müller WE. Effects of piracetam on N-methyl-D-aspartate receptor properties in the aged mouse brain [J]. *Pharmacology*, 1993, 47(4): 217-222.
- [15] Stoll L, Schubert T, Müller WE. Age-related deficits of central muscarinic cholinergic receptor function in the mouse; partial restoration by chronic piracetam treatment [J]. *Neurobiol Aging*, 1992, 13(1): 39-44.

(收稿日期: 2015-12-18 修回日期: 2016-01-16)