

外加直流电场对人晶状体上皮细胞移行和增殖活力的影响

韩 静¹, 刘 珺¹, 严 宏¹, 闫小龙²

基金项目:国家自然科学基金青年项目(No. 81200617); 陕西省自然科学基金(No. 2012JM4055)

作者单位:(710038) 中国陕西省西安市, 第四军医大学唐都医院¹眼科;²胸外科

作者简介:韩静, 毕业于第四军医大学, 博士, 讲师, 主治医师, 研究方向: 电场对眼内细胞生物学行为的调控。

通讯作者:闫小龙, 毕业于第四军医大学, 博士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 电场对肿瘤细胞的作用及机制研究。

yanxiaolong@fmmu.edu.cn

收稿日期:2016-11-18 修回日期:2017-03-10

Effect of the electric field on the migration and proliferation of human lens epithelial cells

Jing Han¹, Jun Liu¹, Hong Yan¹, Xiao-Long Yan²

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81200671); Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No. 2012JM4055)

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

Correspondence to: Xiao-Long Yan. Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China. yanxiaolong@fmmu.edu.cn

Received:2016-11-18 Accepted:2017-03-10

Abstract

• **AIM:** To observe the effect of applied direct electric field (EF) on the migration, cell growth, apoptosis and cell cycle of human lens epithelial cells (hLECs).

• **METHODS:** HLE-B3 cells were exposed to EF at 100mV/mm, 200mV/mm and 400mV/mm, respectively. Cells without EF-exposure were treated as normal controls. Photos of HLE-B3 cells were captured before and after EF-exposure, and the cell numbers were calculated. Apoptosis and cell cycle were detected with flow cytometry after EF-exposure for 24h.

• **RESULTS:** After exposure to EF at 400mV/mm for 3h, HLE-B3 cells showed directed migration to the cathode. The cell number of HLE-B3 cells decreased gradually with continuous EF-exposure, and decreased by 12.6% at 6h and by 18.6% at 12h, respectively ($P < 0.05$). After exposure to EF at 100mV/mm, 200mV/mm and 400mV/mm for 24h, the apoptosis rates of HLE-B3 cells increased dramatically compared to that of the normal control, which were $(9.2 \pm 1.9)\%$, $(23.9 \pm 2.6)\%$ and $(54 \pm 2.5)\%$, respectively ($P < 0.05$). Accordingly, the

results of flow cytometry showed that cell numbers in G2/M phase were increased after EF-exposure, which were $(13.8 \pm 2.2)\%$ and $(15.6 \pm 2.5)\%$ at 200mV/mm and 400mV/mm, respectively ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Applied direct EF induces directed migration of HLE-B3 cells and inhibits the cell growth with the prolongation of the EF-exposure time. EF also induces cell apoptosis and G2/M phase inhibition of the cell cycle in HLE-B3 cells.

• **KEYWORDS:** electric field; human lens epithelial cell; cell migration; apoptosis; cell cycle

Citation: Han J, Liu J, Yan H, et al. Effect of the electric field on the migration and proliferation of human lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(4):619-622

摘要

目的: 观察外加直流电场对人晶状体上皮细胞(lens epithelial cell, LEC)移行和增殖活力的影响。

方法: 将培养的人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 细胞暴露于电场强度为 100、200、400mV/mm 的直流电场中, 未受电场暴露的细胞作为正常对照组。倒置显微镜观察并记录电场暴露前及暴露后的细胞图像, 并计数细胞数目; 流式细胞仪检测电场暴露前及暴露 24h 后的细胞凋亡率和细胞周期。

结果: 强度为 400mV/mm 的电场暴露 3h 后, HLE-B3 细胞呈现朝向电场阴极一侧的定向移行。电场持续暴露后, HLE-B3 细胞数逐渐减少, 在电场作用 6h 和 12h 时分别较正常对照组减少 12.6% 和 18.6%, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。100、200、400mV/mm 电场暴露 24h 后, HLE-B3 细胞凋亡率分别为 $(9.2 \pm 1.9)\%$ 、 $(23.9 \pm 2.6)\%$ 、 $(54 \pm 2.5)\%$, 与正常对照组相比明显增加 ($P < 0.05$); 细胞周期检测结果显示, HLE-B3 细胞进入 G₂/M 期的比例随电场强度增加逐渐上升, 其中 200mV/mm 和 400mV/mm 电场中 G₂/M 期细胞比例分别为 $(13.8 \pm 2.2)\%$ 和 $(15.6 \pm 2.5)\%$, 与正常对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: 外加直流电场可诱导 HLE-B3 细胞的定向移行, 随电场作用时间的延长和电场强度增加, 细胞生长受到抑制, 同时伴随细胞凋亡增加和细胞周期 G₂/M 期阻滞。

关键词: 电场; 人晶状体上皮细胞; 细胞移行; 凋亡; 细胞周期

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.4.07

引用: 韩静, 刘珺, 严宏, 等. 外加直流电场对人晶状体上皮细胞移行和增殖活力的影响. 国际眼科杂志 2017;17(4):619-622

0 引言

后发性白内障 (posterior capsule opacification, PCO) 是当前白内障术后影响视力的最主要原因。其形成是由于白内障术后晶状体后囊膜上残留的 LEC 增殖、移行和转分化而引起后囊膜混浊^[1]。该过程被认为是手术启动了晶状体的异常损伤修复反应,进而诱发 LEC 在后囊膜上增殖、移行,但对于诱发晶状体上皮细胞 (lens epithelial cell, LEC) 出现这一异常生物学反应的信号和机制至今仍未明确。对晶状体的研究显示,当白内障手术将晶状体前囊膜撕开后,即可在赤道部诱发出一个内向电流继而形成电场,这一作用同时增加了赤道部 LEC 的增殖^[2]。已证实,内源性电场广泛存在于机体组织内部,对维持组织的正常生理功能以及组织的损伤修复可能发挥重要作用^[3]。本研究观察电场对人 LEC 的移行、凋亡、细胞周期等生物学活性的影响,为进一步明确电场对人 LEC 的作用、进而探索电场在 LEC 损伤修复过程中可能的调控作用奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 培养人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 细胞株 (美国 ATCC),胎牛血清、低糖型 DMEM 培养液、0.5g/L 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司),Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司);倒置相差显微镜 (德国 Leica 公司);流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 外加电场的制备 外加直流电场设备参照文献^[4]的方法。用硅酮胶将两片平行放置、厚 0.5mm、长 24mm、间距 10mm 的有机玻璃片固定于培养皿底部,其间放入接种有 HLE-B3 细胞的 I 号盖玻片,随即于上方覆盖 II 号盖玻片 (24mm×14mm);硅酮胶密封,即形成一端开放的细胞培养小室,维度为 10mm×24mm×0.5mm。小室两端分别与 10mm×30mm×5mm 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。实验过程中维持电流低于 0.6mA 而减少焦耳热。在实验过程中通过实时检测细胞培养小室两端电压,未见明显波动。控制细胞周围环境于 37°C,50mL/L CO₂。选用的电场强度为 100、200、400mV/mm。未接受电场暴露的细胞做为正常对照组。

1.2.2 细胞移行观察 在 400mV/mm 的电场强度下,显微照相系统连续记录电场作用开始后每 30min 的细胞图像,连续观察 3h,将图像进行比较。

1.2.3 细胞数目计算 细胞在上述电场作用条件下暴露 12h,分别于电场作用前、作用 3、6、12h 后在倒置显微镜下以×2.5 放大倍数照相,并采用 Image-Pro Plus software 7.0 软件计数各图像中细胞数目,实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 细胞分别暴露于 100、200、400mV/mm 电场强度中 24h。弃培养液,用冷 PBS 重悬细胞,1 200r/min 离心 5min,再重复 1 次,最后弃上清,再加 1mL PBS 混匀,转移至 1.5mL EP 管中。加入 5μL Annexin V-FITC,振荡均匀后 4°C 孵育 15min,然后再加入 5μL 碘化丙啶 (PI),同样孵育 5min,随后立即上流式细胞仪分析,检测细胞凋亡情况,每组重复 4 次。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 各实验组处理同上,收集细胞离心,弃上清,加 1mL 冷 PBS 洗 1 次,再加 250mL PBS 吹散混匀,用 750mL 冷无水乙醇缓慢固定,4°C 冰箱过夜。离心后弃上清,收细胞,用 PBS 洗涤后,加 500μL FACS buffer (0.1% BSA, 0.01% NaN₃, 1×PBS) 混悬细胞。加 2.5μL (10μg/mL) RNase,室温消化 15min,再加 25μL PI (1μg/mL, PBS 溶解),避光室温染色 15min。转至流式检测管,用流式细胞仪检测分析细胞周期内细胞 DNA 含量变化。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据资料经 Levene 检验证实方差齐。采用均衡分组单因素干预多水平实验设计,各项检测指标总体差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外加直流电场对 HLE-B3 细胞移行的影响 在本研究采用的实验条件下,当细胞暴露于外加直流电场后,HLE-B3 细胞由静止期被激活,表现为细胞胞体开始收缩。当电场强度低于 400mV/mm 时,细胞的移行与正常对照组相比未见显著变化 (图 1A ~ B)。而当电场强度增加至 400mV/mm 并连续观察 3h 后,HLE-B3 细胞呈现朝向电场阴极一方的定向移行,且该现象随电场作用时间的延长更为明显 (图 1C ~ D)。

2.2 外加直流电场对 HLE-B3 细胞数目的影响 在电场强度为 400mV/mm 的电场中,连续记录 HLE-B3 细胞在电场作用 12h 的情况,并计数细胞数。检测结果显示,在观察时间段内,正常对照组 HLE-B3 细胞数目呈现缓慢增加趋势 (图 2A ~ B)。与此相反,暴露于电场中的 HLE-B3 细胞生长分裂受到抑制,表现为细胞数未出现增加,并随电场作用时间延长细胞数逐渐减少 (图 2C ~ D)。各组间细胞数目比较具有显著统计学差异 ($F = 177.29, P < 0.01$),其中,在电场作用 6h 和 12h 时 HLE-B3 细胞数分别较正常对照组减少 12.6% ($P = 0.04$) 和 18.6% ($P = 0.03$),细胞数差异比较均具有统计学意义 (图 2E)。

2.3 外加直流电场对 HLE-B3 细胞凋亡的影响 流式细胞术分析显示,分别暴露于电场强度为 100、200、400mV/mm 的电场中 24h 后,电场作用对细胞凋亡均产生显著影响 ($F = 74.68, P < 0.01$)。其中各组电场强度下 HLE-B3 细胞凋亡率分别为 (9.2 ± 1.9)%, (23.9 ± 2.6)%, (54 ± 2.5)%,与正常对照组 (2.8 ± 0.6)% 相比明显增加,差异均具有统计学意义 ($P = 0.02, < 0.01, < 0.01$, 图 3)。

2.4 外加直流电场对 HLE-B3 细胞周期的影响 PI 染色法检测细胞周期分析结果显示,电场作用 24h 后,HLE-B3 细胞进入 G₂/M 期的比例随电场强度增加呈现逐渐上升趋势 ($F = 193.45, P < 0.01$)。其中 200mV/mm 和 400mV/mm 电场中 G₂/M 期细胞比例分别为 (13.8 ± 2.2)% 和 (15.6 ± 2.5)%,与正常对照组 (8.8 ± 3.9)% 相比差异具有统计学意义 ($P = 0.03, < 0.01$, 图 4)。

3 讨论

上皮组织由于细胞表层和基底侧离子的不对称分布而产生离子流动,继而形成跨上皮电势。当上皮出现缺损或细胞间紧密连接减弱时,跨上皮电势可驱使电流流出,在上述部位周围产生与其电阻相适应的内源性电场。

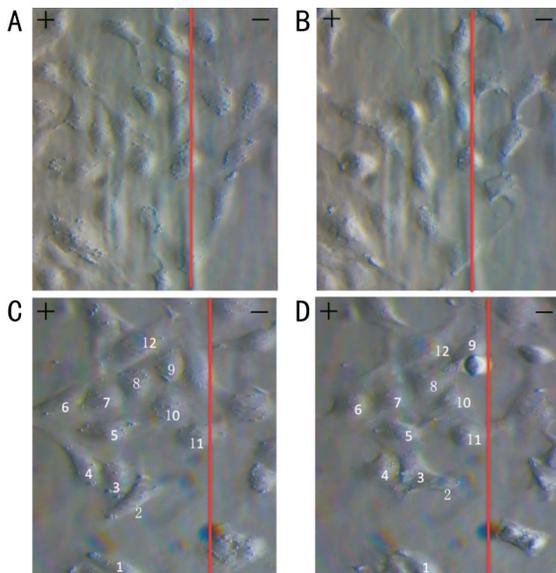


图1 电场暴露对 HLE-B3 细胞移行的影响 A:200mV/mm, 电场暴露前; B:200mV/mm, 电场暴露 3h 后; C:400mV/mm, 电场暴露前; D:400mV/mm, 电场暴露 3h 后; 电场方向以 (-)、(+) 表示。

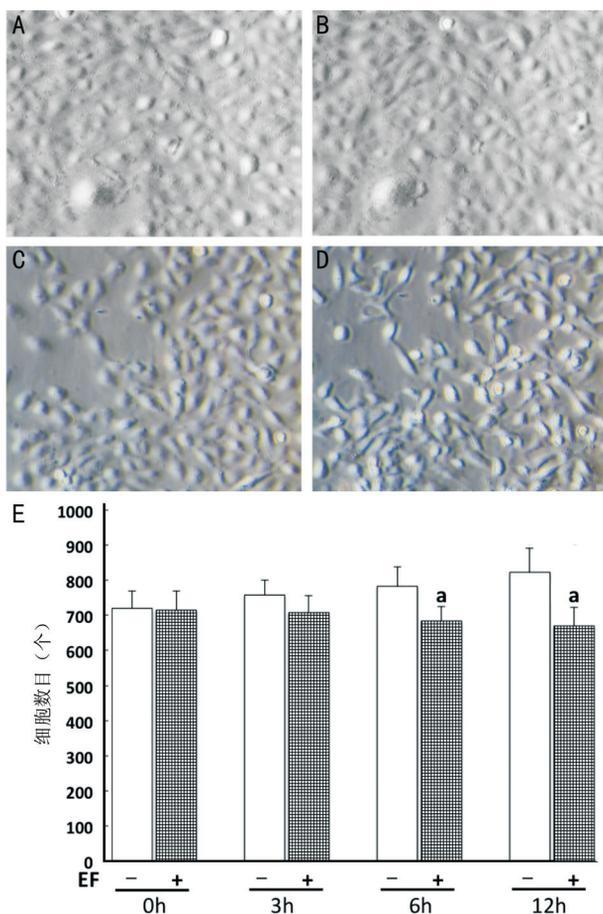


图2 电场暴露对 HLE-B3 细胞数目的影响 A:正常对照组 0h; B:正常对照组 12h; C:细胞暴露于 400mV/mm 电场前; D:细胞暴露于 400mV/mm 12h 后; E:细胞分别在 0、3、6、12h 时与正常对照组相比数目的变化(EF:电场;^a $P < 0.05$ vs 正常对照组)。

在电场作用下,细胞可呈现朝向阴极或阳极方向的定向移动(该现象称为细胞的趋电性)。对牛和大鼠 LEC 的体外实验表明,与内源性电场大小相当的外加直流电场可诱导细胞的定向移行,且随细胞来源、细胞在晶状

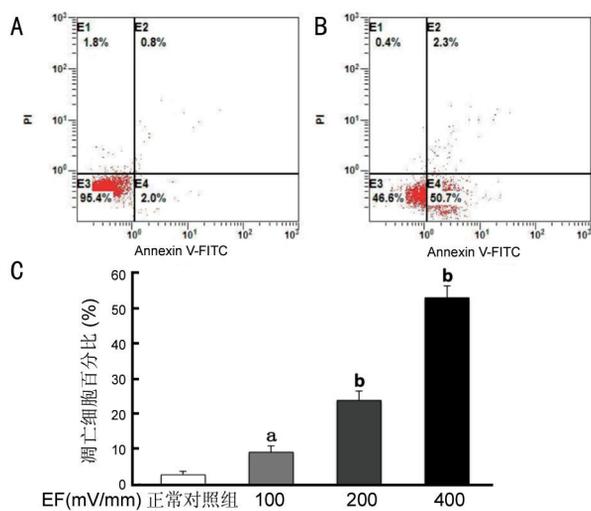


图3 电场暴露后 HLE-B3 细胞凋亡的变化 A:电场暴露前; B:400mV/mm 电场暴露 24h; C:强度为 100、200、400mV/mm 电场暴露后的细胞凋亡率(EF:电场;^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组)。

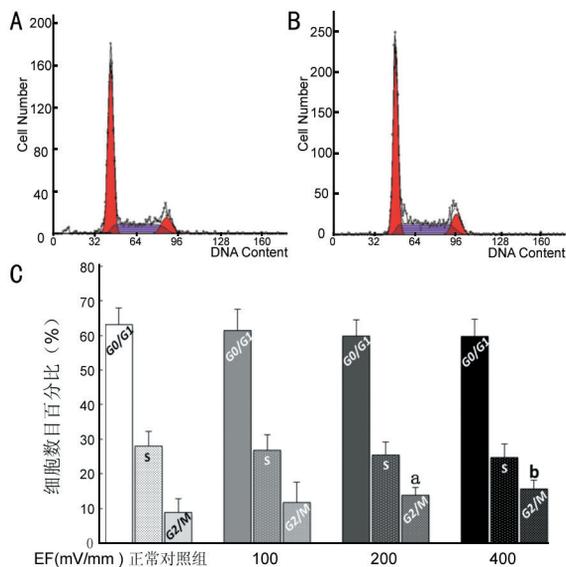


图4 电场暴露后 HLE-B3 细胞周期的变化 A:电场暴露前; B:400mV/mm 电场暴露 24h; C:强度为 100、200、400mV/mm 电场暴露后的细胞周期(EF:电场;^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组)。

体中位置来源和电场强度的不同,移行方向也不同^[5-6]。本研究中依据前期研究结果并参考相关文献^[5-6],采用 100 ~ 400mV/mm 大小电场范围为实验条件,并选择种属来源为人的晶状体上皮细胞系。实验结果显示,在相同观察时间段内(3h),细胞在低电场强度(<400mV/mm)中以形态改变为主,但移行趋势并不明显。而当电场强度增加至 400mV/mm 后,细胞显示出阴极一侧定向移行的趋电性。该现象进一步证实,晶状体上皮细胞的移行可受到外源性电场的调控,其发生与电场强度大小呈正相关。这一现象的发现为明确病理条件下晶状体上皮细胞异常移行的发生机制提供新的线索。

在角膜组织中,电场可通过诱使细胞发生定向分裂进而影响子细胞的定位,表现为促进分裂、增殖的作用,同时诱导角膜神经轴突朝向损伤区域伸展和生长。而对大鼠 LEC 的研究则发现,电场对细胞增殖和单层细胞的损伤修复表现为抑制作用,朝向阴极一侧的损

伤区修复速度较阳极缓慢^[7]。由于细胞种类不同,目前关于电场对细胞增殖的确切作用认识仍不明确。本研究结果显示,电场作用下,12h内晶状体上皮细胞的正常分裂增殖活动即受到抑制,该现象与电场强度呈正相关。另一方面,随着电场作用时间进一步延长至24h,在本实验所选用的各电场强度下细胞均发生凋亡现象,并随电场强度增加凋亡率逐渐增强。这一凋亡现象的发生伴发了细胞周期的抑制,表现为细胞周期阻滞于G₂/M期,并同样与电场强度呈正相关。以上结果提示,电场对晶状体上皮细胞的增生活动呈现负向调控作用,其作用可能主要是通过诱导细胞凋亡的出现和细胞周期的阻滞来实现。

总之,本实验结果显示,外加直流电场可诱导HLE-B3细胞的定向移行,并促进细胞的凋亡,伴随诱导其细胞周期的阻滞。电场发挥上述作用的机制有待进一步研究探索。本研究的结果初步探明电场对人LEC增殖、移行的作用,由于PCO是LEC在晶状体后囊膜上异常的增殖、移行所导致,因此本研究对进一步阐明PCO的发病机制、并通过干预电场调控LEC的异常行为提供实验依据。

参考文献

- 1 Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated. *Arch Ophthalmol* 2009;127(4):555-562
- 2 Wind BE, Walsh S, Patterson JW. Equatorial potassium currents in lenses. *Exp Eye Res* 1988;46(2):117-130
- 3 Zhao M, Dick A, Forrester JV, et al. Electric field-directed cell motility involves up-regulated expression and asymmetric redistribution of the epidermal growth factor receptors and is enhanced by fibronectin and laminin. *Mol Biol Cell* 1999;10(4):1259-1276
- 4 Han J, Yan XL, Han QH, et al. Integrin β 1-subunit signaling is involved in the directed migration of human retinal pigment epithelium following electric fields stimulation. *Ophthalmic Res* 2011;45:15-22
- 5 Wang E, Reid B, Lois N, et al. Electrical inhibition of lens epithelial cell proliferation: an additional factor in secondary cataract? *FASEB J* 2005;19(7):842-844
- 6 Wang E, Zhao M, Forrester JV. Bi-directional migration of lens epithelial cells in a physiological electrical field. *Exp Eye Res* 2003;76(1):29-37
- 7 Wang E, Zhao M, Forrester JV. Electric fields and MAP kinase signaling can regulate early wound healing in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(1):244-249