# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

# 細胞趨電性及其作用機制之探討

## Studying the Galvanotaxis Behavior of Cells and the Underlying Mechanism

計畫編號：NSC 90-2214-E-002-001

執行期限：民國 90 年 08 月 01 日起至民國 91 年 07 月 31 日

主持人：謝學真，台灣大學化工系

計畫參與人員：王翔郁、廖婉君，台灣大學化工系

## 一、中文摘要

細胞受到電場影響而改變其形態或移動方向的現象稱為趨電性(galvanotaxis)。現今對趨電性的機制卻尚不明瞭，電場刺激的功效也未能廣泛應用。本研究選用人類真皮纖維母細胞(normal human dermal fibroblast, NHDF)為研究對象，來探討在電場作用下，不同的生長基質或是不同的抑制劑處理對 NHDF 趨電性的影響。以不同基質而言，施加 1V/cm 電場時，NHDF 在玻璃表面上會朝向正極移動(平均方向指標為-0.37)且移動速率最慢，約為 4 μm/h。在其他四種基質上(組織培養用聚苯乙烯，膠原蛋白，明膠以及幾丁聚醣)，NHDF 的移動方向也朝向正極。其中，在組織培養用聚苯乙烯上有最明顯的方向性，平均移動方向指標為-0.51。在這些基質上，NHDF 移動速率大多為 60 μm/h 左右。若以不同的抑制劑處理，當肌動蛋白纖維的形成、傳統型蛋白激? C(classical protein kinase C, cPKC)的活性或活性氧族群(reactive oxygen species, ROS)的含量受抑制時，會使 NHDF 失去在電場中定向移動的特性，平均方向指標降至-0.07 以下。以螯合劑螯合胞外鈣離子卻會使 NHDF 定向移動更明顯的朝向正極，平均移動方向指標增加為-0.70。而以抑制劑或螯合劑處理的 NHDF 之移動速率都比未處理組為低。由實驗結果可知，將 NHDF 培養在適當基質上可增加其移動速率，在電場中更可將其有效地導向正極移動。而 NHDF 的趨電性需要肌動蛋白的參與，以及 cPKC 與 ROS 扮演胞內訊息傳遞角色。若移去胞外鈣離子會使得 NHDF 胞內鈣離子濃度梯度更加顯著，使得細胞更一致地朝向正極移動。

**關鍵詞**：纖維母細胞、趨電性、生長基質、訊息傳遞

## Abstract

The characteristic of a cell that it moves directionally in an applied electric field (EF) is termed “galvanotaxis”. Though the characteristic is generally taken as a common behavior, the underlying mechanism is not yet clarified. This study investigated the galvanotaxis of normal human fibroblast (NHDF) in an EF and tried to reveal the underlying mechanism through seeding them on different substrata or treating them with several inhibitors separately. NHDF moved toward anode (the average directedness was –0.37) in 1 V/cm EF with a speed of 4 μm/h on glass slips (EF controls). NHDF remained their directional migration toward anode on other four substrata (TCPS, collagen, gelatin and chitosan) with speed over 60 μm/h. NHDF had the largest average directedness of –0.51 on TCPS. Inhibition the formation of F-actin, the classical protein kinase C (cPKCs) and reactive oxygen species (ROS) abolished the directional migration of NHDF in EF on glass slips with average directedness lower than –0.07. But chelating the extracellular calcium ions made NHDF moved more devotedly toward anode with an average directedness of –0.70. The chemical-treated NHDF moved slower than the EF controls with speeds less than 20 μm/h.

**Keywords**: fibroblast, galvanotaxis, substratum, signal transduction

## 二、緣由與目的

近百年來已有許多關於各種細胞受電場作用的研究，使人們了解有效控制電場施加的方式及強度，可能對臨床醫學有相當大的貢獻。目前有關利用電場促進傷口癒合、殘肢再生 (limb regeneration)、骨質生成 (osteogenesis)、中樞神經系統復原 (central nervous system repair)，甚至改變胚胎發展的研究 [1] 一直不斷在進行中。然

而直到現在，有關電場對於細胞的作用機制尚未完全了解，對於電場刺激的功效也未能完全控制及應用。本研究由較偏向應用的觀點出發，選擇尚未用作趨電性研究的細胞株－人類真皮纖維母細胞 (normal human dermal fibroblasts，簡稱 NHDFs)，探討在不同基質表面：包括玻璃、組織培養用聚苯乙烯 (tissue culture polystyrene，TCPS)、明膠(gelatin)、膠原蛋白(collagen)、以及幾丁聚醣(chitosan)；抑制與細胞移動相關的分子：F-actin、cPKC、ROS 以及鈣離子對細胞的趨電行為之影響。期望對於未來細胞趨電性在臨床醫學上的應用能有所貢獻。

## 三、實驗材料與方法

本研究使用正常人類真皮纖維母細胞(NHDF)進行實驗。培養細胞所用的培養液為 DMEM，內含 10％血清(FBS)及 1％三合一抗生素；並添加 25 mM HEPES 以維持培養液的 pH 值。

細胞移動行為量化是以細胞在兩小時之間的位移來決定。移動方向由各細胞移動方向與電場由正到負方向之夾角的餘弦值 cosθ 決定，細胞往正極移動則餘弦值為 -1，往負極移動則為 1，而移動方向垂直電場者為 0。為了解細胞整體移動方向的趨勢，可將圖中所有細胞的餘弦值取平均，定義為「平均移動方向指標」(average directedness，Σcosθ/n)，如 Fig. 1 所示。平均速度則是以實驗進行兩小時後細胞的位移除以時間來計算。

## 四、實驗結果

<u>基質材料對 NHDF 趨電性的影響</u>

在 1 V/cm 電場作用下，NHDF 在各基質表面的移動方向和速度可由 Fig. 2 表示之。整體而言，在電場作用下，NHDF 在各基質材料表面的移動皆朝向正極，不過與玻璃表面比較，各基質之間的平均移動方向性指標並沒有太大的差異，表示改變基質對 NHDF 的定向移動影響不大，平均移動方向指標都在-0.26 到-0.50 之間。對於 NHDF 移動的速度方面，與玻璃表面比較在其他各種基質上 NHDF 移動速度均加快，如 Table 1 所示，移動速度由 4 μm/h 增加到 27 μm/h。

<u>胞內訊息傳遞相關分子所扮演的角色</u>

本部分實驗的結果如 Fig. 3 所示。NHDF 在 1 V/cm 的電場作用下，朝向正極移動，平均移動方向性指標為-0.37。將胞外的鈣離子以 EGTA 螯合之後，NHDF 朝向正極移動的行為更加明顯，平均移動方向指標為-0.66。當加入 cytochalasin D 抑制肌動蛋白 actin 的聚合會使得 NHDF 失去定向移動的特性，相似的結果也出現在使用 Go6976 抑制 cPKC 的活性或是使用 NAC 抑制 ROS 的實驗組中，平均移動方向指標都幾乎為 0。由 Table 2 可看出，在移動速度方面，將胞外鈣離子螯合之後，NHDF 移動速度加快到 8.64 μm/h，而其他三種處理方法會使得 NHDF 移動速度減低到 2.21 μm/h 以下。

## 五、討論

材料表面之粗糙度(roughness)、可濕性(wettability)以及表面所帶的電性會影響白蛋白的吸附，而白蛋白的吸附會影響細胞在材料表面的附著。由 Fig. 4 (來源:88 年度國科會計畫成果)可得知，白蛋白在幾丁聚醣的表面吸附量最大，將造成與纖維黏連蛋白的競爭吸附，使得細胞較不易附著。由先前實驗結果得知，生長在幾丁聚醣表面的 NHDF 都較不容易附著，所以受到電場作用時，NHDF 會有較大的移動速度。

至於與細胞生物相容性良好的膠原蛋白，會使得生長在其上的 NHDF 會移動得很快，且都表現出相當良好的趨電性。此原因可能為，細胞可直接附著於膠原蛋白，或是與吸附在膠原蛋白表面的纖維黏連蛋白 (fibronectin) 和透明質蛋白 (vitronectin)結合[2]；纖維黏連蛋白和透明質蛋白皆可促進細胞的附著和移動，故生長在膠原蛋白的細胞，受電場作用時趨電現象很明顯。另外，有研究指出 [3] 膠原蛋白內含有一段特別的胺基酸序列，可促進真皮纖維母細胞胞內鈣離子的濃度，而鈣離子的濃度正好與細胞的趨電表現相關。也正因為如此，本實驗選擇用 EGTA 螯合胞外鈣離子來觀察 NHDF 趨電性的改變，結果與將 NHDF 培養在膠原蛋白上相似。相關實驗結果指出，有可能是因為電場刺激 NHDF 使其釋放胞器中的鈣離子，讓胞內鈣離子濃度增加，所以增加其移動速度[4]。且鈣離子因為電場作用而堆積在細胞靠近負極的一端，使得 NHDF 定向移動更加明顯。

肌動蛋白 actin 的聚合和單體化過程是細胞移動重要的一環[5]。抑制 F-actin 的

聚合使得 NHDF 在電場中失去特定的移動方向且移動速度相當緩慢，顯示 F-actin filament 不僅影響正常的細胞移動，在 NHDF 的趨電性中也相當重要。

許多相關的實驗指出，各種形式的 PKC 對不同細胞的趨電性有不同的影響，例如：抑制 PKC-α使得內皮細胞在體外培養的情形下無法移動[6]，而人類的神經膠細胞倚靠 PKC-ε來傳遞跟細胞移動有關的訊息[7]。本實驗發現，NHDF 與趨電性相關的激? 為 PKC-α及 PKC-β1。另外，與 PKC 有著密切關係的訊息傳遞分子為 ROS，抑制了 ROS 的活性之後，NHDF 在電場中也失去了定向移動的能力，且移動速度也降低。Rosado 指出 hydrogen peroxide (ROS 的一種)可以增加 pancreatic canard cells 中 actin filament 的含量，且跟細胞自我修復的能力有關[8]。另外，ROS 也會促進血管內皮細胞的 actin fiber 形成[9 ]。所以抑制了 ROS，可能使得 NHDF 細胞中的 actin filament 量無法增加，進而造成 NHDF 速度減慢且失去定向移動能力。

## 六、結論

NHDF 在電場中的趨電性會受到培養基質不同和許多與細胞移動相關的分子影響。將 NHDF 培養在常用的基質材料上(包括 TCPS、膠原蛋白、明膠和幾丁聚醣)都會使得 NHDF 的移動速度加快，但是 NHDF 移動的方向與控制組(玻璃表面)沒有太大的差異。而螯合胞外鈣離子會使得 NHDF 移動加快且移動方向更加一致地朝向正極，原因可能為電場刺激 NHDF 使胞內鈣離子濃度增加且造成靠近負極一端濃度較高的濃度梯度。而抑制 F-actin 的生成使得 NHDF 失去趨電性，顯示 F-actin 為 NHDF 表現趨電性過程中重要的 cytoskeleton 之一。相似的實驗結果也出現在抑制了 cPKC 和 ROS 的實驗中，代表這兩種胞內訊息傳遞物質在 NHDF 的趨電性中也佔有相當重要的地位。

## 七、參考文獻


[1] Bogress RB. Robinson KR, Vanable Jr. JW, and McGinnis ME. 1989. Electric fields in vertebrate repair: natural and applied voltages in vertebrate regeneration and healing. Alan R. Less, Inc., New York.

[2] Yamamoto A., Misaim S., Maruyama N, and Summit M. 2000. Quantitative evaluation of cell attachment to glass, polystyrene, and fibronectin- or collagen-coated polystyrene by measurement of cell adhesive shear force and cell detachment energy. *J. Biomed. Mater. Res.* **50**: 114-124.

[3] Guignandon A, Mineur P, Lambert CA, Nusgens BV, and Lapiere CM. 1998. The collagen I sequence DGEA raises $[Ca^+]_i$ in dermal fibroblasts. Modulation by extracellular matrix. *J. Dermatol. Sci.* **16**: S123.

[4] Rabinowitz JR. 1982. The effect of electric field induced perturbation of the distribution of ions near the cell surface on migration of charged membrane components. *J Theo Biol* 99: 377-387.

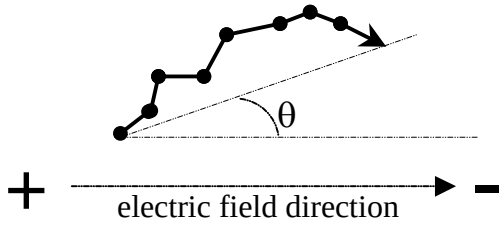
[5] Bray D. 2000. *Cell Movement: form molecules to motility*. 2nd. Ed. Grand Publishing, NY.

[6] Wang A, Momura M, Patan S and Ware JA. 2002. Inhibition of protein kinase C alpha prevents endothelial cell migration and vascular tube formation in vitro and myocardial neo-vascularization in vivo. *Circ Res* 90: 609-616.

[7] Besson A, Davy A, Robbins, SM and Yong VW. 2001. Differential activation of ERKs to focal adhesions by PKC epsilon is required for PMA-induced adhesion and migration of human glioma cells. *Oncogene* 20: 7398-7407.

[8] Rosado JA, /Gonzalez A, Salido GM, and Gorman RR. 1988. Effects of reactive oxygen species on actin filament polymerization; and amylase secretion in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal* 14:547-556.

[9] Van Wetering S, Van Buul JD, Quik S, Mul FP, Anthony EC, Klooster JP, Collard JG, and Hordijk PL. 2002. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J cell Sci* 115:1837-1846.


Average Directedness =

$$< \cos\theta > = \frac{\sum_n \cos\theta}{n} = \begin{cases} 1: \text{Cells migrate perfectly toward anode.} \\ 0: \text{Cells migrate randomly.} \\ -1: \text{Cells migrate perfectly toward cathode.} \end{cases}$$

**Fig. 1** A drawing outlines the method to quantify the directedness of the average cellular translocation. θ is the angle between the field vector and the cellular translocation direction and n is the total number of

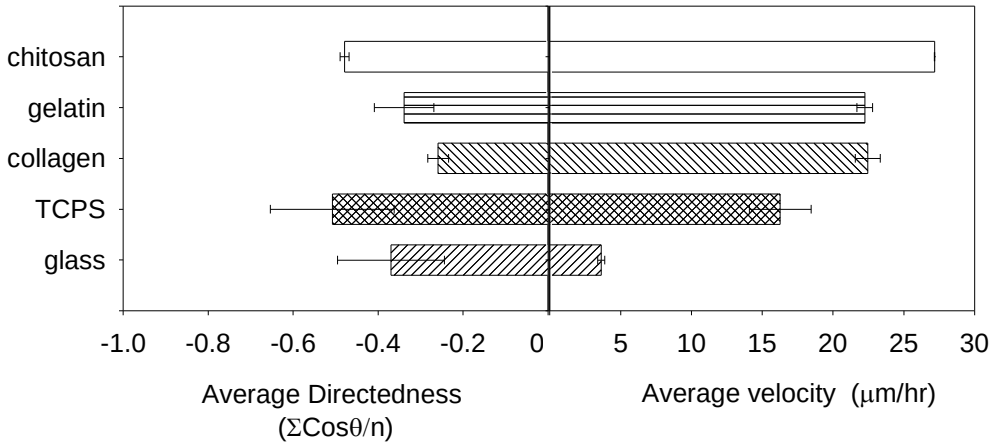



**Fig. 2** The average directedness and velocity of NHDF on different substrata in 1 V/cm EF.

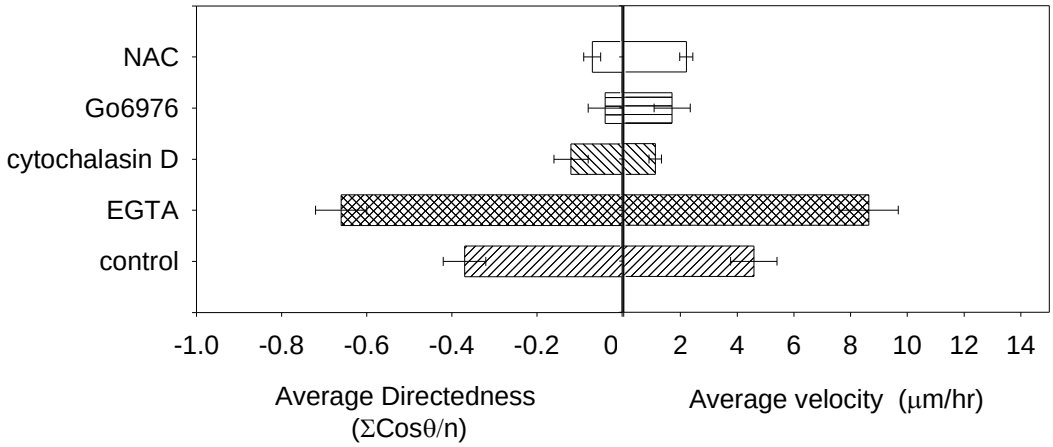



**Fig. 3** The average directedness and velocity of NHDF under different chemical treatments in 1V/cm EF.

**Table 1** The average directedness and velocity of NHDF on different substrata in 1V/cm EF.

| Substratum | Σcosθ/n | Average Velocity (μm/hr) |
|---|---|---|
| Glass (control) | -0.37±0.12 | 3.64±0.26 |
| TCPS | -0.50±0.15 | 16.27±2.18 |
| Collagen | -0.26±0.02 | 22.45±0.88 |
| Gelatin | -0.34±0.07 | 22.24±0.56 |
| Chitosan | -0.48±0.01 | 27.16±0.01 |

**Table 2** The average directedness and velocity of NHDF under different chemical treatments in 1V/cm EF.

| Treatment | Σcosθ/n | Average Velocity (μm/hr) |
|---|---|---|
| Control | -0.37±0.12 | 3.64±0.26 |
| EGTA | -0.66±0.06 | 8.64±1.04 |
| Cytochalasin D | -0.12±0.04 | 1.12±0.22 |
| Go6976 | -0.04±0.04 | 22.24±0.56 |
| NAC | -0.48±0.01 | 27.16±0.01 |

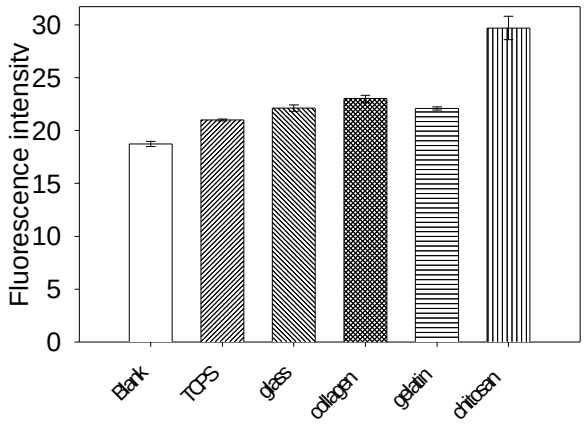



**Fig. 4** Fluorescence intensity of FITC-conjugated BSA adsorbed on different substrata.

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　※
※　　細胞趨電性及其作用機制之探討　　※
※　**Studying the Galvanotaxis Behavior of Cells**　※
※　**and the Underlying Mechanism**　※
※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：■個別型計畫　　□整合型計畫

計畫編號：NSC90－2214－E－002－001

執行期間：90 年 08 月 01 日起至 91 年 07 月 31 日


計畫主持人：謝學真

計畫參與人員：王翔郁，廖婉君


本成果報告包括以下應繳交之附件：無

□赴國外出差或研習心得報告一份

□赴大陸地區出差或研習心得報告一份

□出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

□國際合作研究計畫國外研究報告書一份


執行單位：台灣大學化工系


中　華　民　國　91 年　10 月　15 日