视网膜感光细胞对仿生电场刺激的非矢量应答

杨极^{1,2†}, 王青锋^{1,2†}, 林蒙^{1,2}, 何凯文^{1,2}, 雷新兰^{1,2}, 高美玲^{1,2}, 潘登^{1,2*}, 金子兵^{1,2*}

1. 温州医科大学干细胞研究所, 温州医科大学附属眼视光医院视网膜再生医疗、眼科遗传学研究实验室, 温州 325027;

2. 视光学与视觉科国家重点实验室, 温州 325027

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: dengpan718@mail.eye.ac.cn; jinzhang@mail.eye.ac.cn

收稿日期: 2017-10-23; 接受日期: 2018-01-06; 网络版发表日期: 2018-04-12

国家自然科学基金(批准号: 81371059, 81522014, 81600772)、国家重点研发计划(批准号: 2017YFA0105300, 2017YFB0403702, 2013CB967502)、浙江省自然科学基金(批准号: LQ17H120005)、浙江省重点研发计划(批准号: 2015C03029)、温州科技创新团队(批准号: C20150004)和浙江省新苗人才计划(批准号: 2016R413027)资助

摘要 正常状态下眼组织的细胞暴露于生物体内生电场中, 故电场可以调控眼组织细胞一系列的生物学性能. 细胞对电场信号的应答可分为两个方面, 细胞对电场矢量的应答(迁移、定向生长等)和细胞对电场刺激的非矢量应答(增殖、凋亡等), 而细胞对电场矢量的应答是最常见的应答现象. 同时, 细胞外的电场也能引起细胞内的信号转导, 进而调控细胞的行为, 但是对细胞内的应答机制目前知之甚少, 所以对细胞非矢量性应答的机制也了解甚少. 而感光细胞对电场刺激非矢量性应答的分子机制目前研究处于空白阶段, 故本研究着重于探究感光细胞对于电场刺激的非矢量性应答的机制. 为了探究电场刺激对感光细胞的影响, 本课题组自主研发了一款电场刺激仪, 研究发现, 60和90 mV/mm强度的电场刺激能提高细胞活性, 促进细胞增殖. 检测基因表达谱, 利用通路分析发现, Ca^{2+} 离子依赖的ERK通路在细胞对电场刺激的应答中扮演重要角色. 实验结果进一步证明, 电场刺激促进 Ca^{2+} 离子内流进而改变了感光细胞的生长平衡, 可以预见电场影响感光细胞的离子转运在感光细胞对电场刺激的应答过程中具有重要的意义. 总而言之, 本课题组发现, 电场影响细胞内外的 Ca^{2+} 离子流, 引发细胞内一系列的级联反应, 使细胞的生长状态发生了改变.

关键词 电场, 细胞行为, ERK通路, Ca^{2+} 离子流

生物体中含有大量的液体, 包括组织液、血液和细胞内液, 液体中含有大量的带电粒子, 如 Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} 和带电的蛋白质等^[1]. 离子通道的转运作用产生电势差, 带电粒子的运动及粒子间相互作用在生物体中产生了内生电场. 正常生理状态下组织和细胞暴露在内生电场中, 其生物学行为受到内生电场的影响.

内生电场调控了一系列细胞的行为, 包括细胞定向生长、细胞迁移、细胞延长等^[1,2].

眼睛能感受光刺激, 同时也具有诸多独特的电性能. 生理状态下眼睛存在诸多的生物电场, 如跨角膜上皮电势差(transcorneal potential difference, TCPD)、跨晶状体上皮电势差和跨视网膜色素上皮电势差

引用格式: 杨极, 王青锋, 林蒙, 等. 视网膜感光细胞对仿生电场刺激的非矢量应答. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 544–555

Yang J, Wang Q F, Lin M, et al. Nonvectorial responses in photoreceptor cells stimulated by electrical fields (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 544–555, doi: 10.1360/N052017-00243

(TEP). 细胞在自然状态下暴露于内生电场中, 电场同样也调控细胞的生物学行为^[3].

为了探究内生电场调控细胞行为的机制, 首先得模拟生理状态下的内生电场. 许多学者研发了能对体外培养的细胞进行刺激的电刺激仪, 生理幅度的内生电信号在体外被模拟^[4,5]. 许多实验证据都支持体外模拟电信号和内生电信号一样具有调控细胞生物学行为的能力. 例如, 自然状态下, 当角膜上皮损伤后, 由于局部上皮屏障受到了破坏, 会产生一个由周边指向损伤部位中心的电场, 此电场可促进角膜上皮的迁移、定向生长, 最终促进伤口愈合; 刺激体外培养的角膜上皮细胞, 发现细胞在电场中能迁移, 并且细胞形态变长, 细胞长轴和电场矢量垂直, 细胞产生了与内生电场刺激类似的应答反应^[6-8].

为什么电场能够对细胞的迁移和生长进行方向性的调控呢? 这归结于电场是一个矢量, 它能够控制带电粒子在其中的运动, 导致了蛋白质在细胞膜和细胞质中的重分布, 从而细胞发生迁移和重定向^[7,9,10]. 同时, 电场能不对称地激活细胞信号通路以影响细胞的行为, 如PI3K通路、MAPK通路等. 电场也能影响离子的分布和改变细胞的电渗透性, 这也是细胞对电刺激应答的一个机制. 大量的研究结果都是利用非神经元细胞得到的, 然而眼睛神经细胞对电场刺激的应答机制目前还不清楚, 如感光细胞对电场刺激的应答.

电场是一个矢量, 具有方向性, 故细胞对电场最明显的应答模式是针对电矢量的应答, 所以许多研究都集中在探究细胞矢量性应答的机制, 如迁移、定向生长、细胞延长等. 同时电场刺激也可直接激活细胞内的信号通路, 进而调控细胞行为, 领域内称之为非矢量应答. 但是对细胞外模拟电信号如何激活胞内信号转导知之甚少, 关于细胞对电场非矢量应答的认识和研究也较为稀少. 电场调控眼睛细胞的应答的研究结果都是利用非神经细胞作为研究模型而得出的, 至于电场信号对眼睛神经细胞非矢量性的影响, 尤其是电场对感光细胞的影响, 其分子机制研究完全处于空白阶段.

故本研究旨在自主研发能对离体细胞进行稳定刺激的电刺激仪, 在体外模拟生理幅度的电场信号^[11,12], 探究电场刺激对感光细胞的非矢量性的影响, 明确感光细胞在电场中状态变化的情况, 并对分子机制进行探究, 以填补领域内的空白.

1 材料与方法

1.1 研究对象的选择

因为感光细胞难以分离纯化, 而且分离纯化后的感光细胞也难以在体外进行长时间的培养, 所以这就有必要找寻合适的细胞模型进行研究. 因此, 本研究主要采用领域内学者们普遍接受的661W鼠源视网膜感光细胞系(此细胞系视锥细胞占多数)作为细胞模型. 该细胞系来源于表达SV-40T抗原的转基因小鼠(*Mus musculus*)视网膜感光细胞, 转入人类感光蛋白启动子后, 将其永生化而获得. 本课题组也用免疫染色的方法证明了所选用的细胞是感光细胞来源(网络版附图1). 661W细胞由美国俄克拉荷马州健康科学中心大学的Dr. Muayyad R. Al-Ubaidi提供^[13]. 661W细胞选用高糖DMEM培养基, 于细胞培养箱内37℃, 5% CO₂条件下培养. 高糖DMEM培养基中应包含10% FBS及1% PS.

1.2 细胞电刺激模型的建立

为了探究内生电场对感光细胞的影响, 首先得研发一款电刺激装置来模拟生理幅度的内生电场. 故本课题组旨在研发一款电流、电压恒定, 时间可控的离体细胞电刺激定量研究装置, 以达到能对单个或多个培养孔多梯度同时刺激的目的. 为了保证电刺激时细胞培养条件不变, 决定将刺激电极和传统细胞培养皿相结合, 并且保证输出电源稳定. 电刺激装置由以下几部分组成: 电源输出装置、外置连接电路、刺激电极. 其中, 购买了德国Reutlingen公司生产的微电压输出装置(Stimulus Generator 4002, Multi-Channel Systems, Reutlingen, 德国)作为电刺激仪的电源(图1A), 该装置具有两个输出口, 可同时输出两种不同幅度的电信号. 本课题组研发了能和6孔板培养皿配套使用的刺激电极(图1B和C), 在培养皿中插入电极, 连上刺激线路即可进行刺激. 其中电极参数如下: 电极深度为15 mm, 两根水平电极之间的间距为10 mm, 浸没在培养皿中的电极长度为31 mm, 两皿之间电极间距为7.5 mm, 刺激电极与培养皿底部细胞间的距离为3 mm (图1D).

本研究旨在探究内生电场对视网膜感光细胞的影响, 故采用恒定场强, 恒定电压的电刺激模式. 仪器刺激参数设置如下: 单向直流电, 输出模式为(monophasic rectangular pulses), 输出强度为600, 900和1200 mV.

图1 电刺激装置(网络版彩图)

A: 双通道电源输出装置; B: 电刺激装置模拟图; C: 与六孔板配套使用的U型铂金刺激电极实物图; D: 刺激电极设计的具体参数; E: 24 h电压检测, 刺激装置输出电压稳定

根据电极间的间距计算出电场强度分别设为60, 90, 120 mV/mm. 为了控制变量, 本研究采取时间不变, 探究不同强度内生电场对感光细胞的影响, 故控制刺激时间为24 h, 对照组细胞插入电极, 但是不进行电刺激.

1.3 细胞活性及细胞计数

利用CCK-8试剂盒(CEL-CCK, 迈博公司, 上海)来检测661W细胞活性^[14]. 六孔板培养皿每个孔中传入 5×10^5 个细胞, 培养24 h后进行电刺激. 刺激24 h后, 收集每个培养皿中的细胞, 用500 μ L培养基将细胞悬浮, 然后加入96孔板培养皿中, 每个孔中加入100 μ L培养基和10 μ L CCK-8溶液, 六孔板培养皿每个孔样本在96孔板培养皿内分为5孔. 37 $^{\circ}$ C培养箱中放置1 h, 用酶标仪测量450 nm波长下的吸光值(Spectra Max多功能酶标仪, Molecular Devices, 美国). 消化六孔板培养皿中的细胞, 使用血球计数板对每个皿的细胞进行直接计数, 每个皿内的细胞计数3次, 计算每个独立实验组细胞数量的平均值. 每个独立实验至少重复3次.

1.4 细胞增殖实验

种入细胞爬片, 对照组和电刺激组中均加入EdU

溶液(英杰公司, 美国), 电刺激24 h后, 收取对照组和电刺激组中的样本. 用4%浓度的多聚甲醛在室温下固定爬片上的细胞10 min, 用PBS洗2遍, 每遍5 min. 接下来用溶于PBS的0.5% Triton X-100溶液对细胞进行10 min处理. 用3% FBS清洗3遍, 每遍5 min, 用共聚焦显微镜拍摄细胞照片, 放大倍数40倍(Zen lite 2012, 蔡司, 德国). 同时也对细胞进行悬浮染色, 步骤同细胞爬片染色, 用流式细胞仪进行计数, 评估细胞增殖的比率(BD公司, 美国). 每个独立实验至少重复3次.

1.5 表达谱

用TRIzol试剂裂解细胞, 提取了对照组和60 mV/mm强度组的细胞的总RNA (英杰公司, 美国), 利用基因芯片检测提取的RNA样本基因表达差异. 本次实验应用的是Mouse One Array Plus MOA2.1 (Phalanx Biotech Group, CN)芯片, 对于芯片的数据采用了生物信息学的手段进行分析. 利用单因素方差分析的方法来比较对照组和60 mV/mm组间的基因表达倍数差异, 同时认为表达上调2倍及下调200%的基因是变化差异明显的基因. 得到的基因表达差异数据进行了GO分析和Pathway分析.

1.6 逆转录PCR和定量PCR

电刺激后, 用TRIzol试剂裂解细胞(英杰公司, 美国), 将样本放置于 -80°C 冰箱保存. 提取对照组和电刺激组的RNA, 用NanoDrop2000测定所提取RNA浓度, 按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录PCR (TaKaRa, 大连)获得cDNA. 利用SYBR Green Master试剂和ABI Prism 7800HT仪器来进行定量PCR (Applied Biosystems, 美国), 验证与ERK通路相关的基因的表达水平. 定量PCR扩增反应体系如下: 94°C 预变性10 s; 94°C 变性5 s, 60°C 退火30 s, 72°C 延伸15 s, 进行40个循环延伸反应产物. 反应结束后检测扩增产物溶解曲线, 根据仪器软件自动设置阈值, 生成 C_t 值. 每个样品设置3个重复孔, 独立实验至少重复3次. 引物序列: *BDNF* (上游引物: 5'-TCATACTTCGGTTGCATGAAGG-3', 下游引物: 5'-AGACCTCTCGAACCTGCCC-3'). *FOS* (上游引物: 5'-CGGGAGGTTCTT GTTCTG-3', 下游引物: 5'-TTTGTGGCTTGCTTGAC-3'). *GAPDH* (上游引物: 5'-CGGGTTTCAACGCCGACTA-3', 下游引物: 5'-TTGGCACTAGAGACGGACAGA-3').

1.7 蛋白质印迹试验

按照之前所述方法提取细胞蛋白质并进行相关准备工作, 将准备好的蛋白样本放置于 -80°C 冰箱保存^[15]. 取低温保存的蛋白样本, 进行SDS-PAGE电泳, 并转印到醋酸纤维膜上, 质量分数5%的脱脂奶粉溶于TBST溶液中封闭醋酸纤维膜1 h. 分别加入如下浓度抗体: ERK1/2 (rabbit/1:1000/CST公司, 美国), p-ERK1/2 (rabbit/1:2000/CST公司, 美国), CREB (rabbit/1:1000/CST公司, 美国), p-CREB (rabbit/1:1000/CST公司, 美国), BDNF (rabbit/1:1500/abcam公司, 美国), GAPDH (mouse/1:5000/KANGCHEN公司, 中国), 加入一抗后 4°C 过夜孵育. 第二天室温回温1 h, 用TBST清洗膜3次, 每次10 min. 将清洗后的膜放入二抗中孵育1 h (1:5000/LI-COR公司, 美国), 用TBST清洗膜3次, 每次10 min. 用Odyssey扫描仪采集信息(LI-COR公司, 美国). 每个目标蛋白均有3次独立重复实验, 用Image J对蛋白条带进行定量灰度分析(Image J 1.44 p, Wayne Rasband, NIH, 美国), 分别检测目的蛋白和内参蛋白灰度值, 将目的蛋白表达量和内参蛋白GAPDH灰度值相比较, 得出蛋白表达量比值, 用Graphpad prism5.0统计

软件进行分析. 每个独立实验至少重复3次.

1.8 Ca^{2+} 通路阻滞

选用广谱 Ca^{2+} 离子通道阻滞剂西尼地平(百灵威公司, 北京)来阻滞细胞 Ca^{2+} 离子通道. 其中将 Ca^{2+} 离子通道阻滞剂溶解在二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中, 培养基中阻滞剂终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$. 对照组, 60 mV/mm 组和 90 mV/mm 组均加入西尼地平, 刺激24 h后收取细胞样本, 进行相关实验.

1.9 统计学处理

本研究所得数据经Shapiro-Walk检验呈正态分布. 使用Graphpad prism5.0统计软件对CCK-8, EdU, Q-PCR和WB灰度分析结果进行统计分析, 数据采用 $\bar{x}\pm\text{SE}$ 表示, 两组间比较用成组Student's *t*-test, $P<0.05$ 认为有统计学意义, 其中“*”表示 $P<0.05$, “**”表示 $P<0.01$, “***”表示 $P<0.001$.

2 实验结果

2.1 细胞电刺激实验的流程

对仪器实际输出的电压进行监测, 发现电刺激仪能够保证稳定的电压输出, 能对培养皿中的细胞进行稳定的电刺激(图1E). 本实验具体流程如图所示, 将一定数量的661w细胞传入六孔板培养皿中培养24 h, 电刺激前换无血清培养基, 适应1 h后给以电刺激24 h, 收取样本进行一系列实验(图2).

2.2 电场刺激后细胞形态、活性和数量的改变

24 h电刺激后, 首先从形态学上来观察细胞的差异. 发现电刺激组和实验组细胞形态存在差异(图3A), 其中对照组细胞均匀生长, 而 60 mV/mm 刺激组中部分细胞呈聚集样生长, 90 mV/mm 刺激组中细胞聚集样生长更明显, 120 mV/mm 刺激组中则可见部分细胞漂浮, 出现了细胞死亡. 因为细胞存在明显的形态差异, 决定进一步探究细胞活性和细胞数量的变化.

利用CCK-8试剂盒检测细胞活性. 结果显示, 60 mV/mm 组和 90 mV/mm 组中细胞活性相比于对照组有一定程度提高, 其中 90 mV/mm 组中细胞活性略高于 60 mV/mm , 说明电刺激能提高细胞活性(图3B). 利用血球计数板进行计数发现, 60 mV/mm 组和

图2 电刺激实验步骤(网络版彩图)

步骤如图所示, 将细胞按所需浓度传入6孔板培养皿中, 培养24 h. 刺激前将培养基换为无血清培养基, 适应1 h后给以电刺激. 其中本实验设置3个组, 对照组不施加电刺激, 实验组给以不同强度电刺激

图3 细胞形态、活性和数量(网络版彩图)

A: 对照组和电刺激组细胞形态; B: CCK-8试剂盒检测对照组, 60 mV/mm刺激组和90 mV/mm刺激组细胞活性, 酶标仪测量450 nm波长下吸光值, 电刺激提高了细胞活性; C: 血球计数板对细胞进行直接计数, 电刺激提高了细胞数量

90 mV/mm组中细胞数量相比于对照组均有一定程度的提升(图3C), 其中90 mV/mm组中细胞数量略多于60 mV/mm, 说明电刺激可能在一定程度上促进了细胞增殖.

电场刺激对细胞生长有影响, 改变细胞活性和细胞数量, 且此改变量在一定电场强度范围内存在电场强度依赖关系. 但是电刺激对细胞增殖的影响还需要进一步探究.

2.3 电场刺激促进661W细胞增殖

为了明确电刺激是否促进细胞增殖, 加入了核酸类似物EdU. 首先借助共聚焦显微镜拍摄了EdU染色的细胞照片(图4A), 发现电场刺激后60 mV/mm组和90 mV/mm组中EdU阳性细胞数量相比于对照组均增加, 其中90 mV/mm组中EdU阳性细胞数量略多于60 mV/mm组(图4B). 为了明确结果可信度, 将悬浮细胞进行染色, 利用流式细胞仪进行检测, 证实了以上结果, 流式结果显示, EdU阳性细胞比率90 mV/mm组多于60 mV/mm组多于对照组(图4C). 但电刺激促进细胞增殖的机制仍不明确, 需要进一步进行探究.

2.4 电场刺激激活ERK通路促进细胞增殖

为了探究电刺激促进细胞增殖的机制, 制作了对照组和60 mV/mm刺激组的基因表达谱. 富集分析基因表达结果后发现表达差异达2倍的基因有777个, 在这中间上调基因351个, 下调基因426个, 绘制了基因表达差异火山图(图5A). 同时针对变化达2倍的基因, 利用Pathway分析进行富集发现, 电刺激后 Ca^{2+} 离子转导相关通路和MAPK通路基因变化最明显(图5B). 进一步关注了MAPK通路, 此通路细胞增殖密切相关, 而 Ca^{2+} 离子转导相关通路则与 Ca^{2+} 离子内流和外转密

切相关. 基于生物信息学的分析, 注意到细胞内游离 Ca^{2+} 离子作为重要的二级信号转导分子, 参与了MAPK通路中ERK分支的激活, 而ERK分支中的ERK蛋白和其下游CREB蛋白的磷酸化水平与细胞增殖密切相关.

为了明确电刺激是否是通过调控 Ca^{2+} 离子依赖的ERK通路进而提高细胞活性和促进细胞增殖, 决定进一步探究ERK通路中ERK蛋白及CREB蛋白磷酸化水平. 运用Western blot进一步探究ERK蛋白磷酸化水平, 发现电刺激后60 mV/mm组和90 mV/mm组的ERK磷酸化水平相比于对照组明显上调, 其中90 mV/mm组ERK蛋白磷酸化水平大于60 mV/mm组(图5C和D). 进一步用Western blot探究下游CREB蛋白磷酸化的水平, 发现电刺激后60 mV/mm组和90 mV/mm组的CREB磷酸化水平相比于对照组上调(图5E和F).

2.5 电场刺激提高ERK通路相关基因的表达

为了进一步探究磷酸化的ERK蛋白和磷酸化的CREB蛋白调控的下游靶基因, 结合基因表达谱, 利用KEGG数据库进行筛选. 通过大量的分析和预实验, 锁定了位于ERK通路下游的FOS和BDNF基因, FOS基因控制细胞的增殖, 调控细胞的存活; BDNF基因则与细

图4 细胞增殖

A: EdU免疫染色, 共聚焦显微镜40倍照片, EdU红色, DAPI蓝色; B: 60 mV/mm刺激组和90 mV/mm刺激组细胞增殖比率高于对照组; C: EdU染色流式细胞计数结果提示60 mV/mm刺激组和90 mV/mm刺激组细胞增殖比率高于对照组

细胞的存活、营养密切相关。运用定量PCR进一步探究了*FOS*和*BDNF*基因的表达水平,发现电刺激后60 mV/mm组和90 mV/mm组中两个基因表达上调,其中90 mV/mm组基因表达水平高于60 mV/mm组(图6B和C)。同时运用Western blot进一步探究了BDNF蛋白的表达量,发现60 mV/mm组和90 mV/mm组中BDNF蛋白表达量相比于对照组均有提升(图6D和E)。

2.6 Ca^{2+} 离子阻滞逆转661W细胞对电场刺激的应答效应

为了明确电场刺激促进 Ca^{2+} 离子内流对ERK通路的激活作用,选择了广谱 Ca^{2+} 离子通道阻滞剂西尼地平来对其机制进行探究。据了解,视网膜感光细胞上存在着L型和N型 Ca^{2+} 离子通道,而西尼地平可对此两型 Ca^{2+} 离子通道进行阻滞^[16]。大量的研究表明,此两型 Ca^{2+} 离子通道与细胞增殖密切相关。加入10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 Ca^{2+} 离子通道阻滞剂,发现加入 Ca^{2+} 离子阻滞剂组细胞生长受到了一定程度抑制(网络版附图2)。同时,对加入 Ca^{2+} 离子通道阻滞剂组施加电刺激,用CCK-8对电刺激后的细胞活性进行了检测,发现加入 Ca^{2+} 离子阻滞剂后电刺激组中细胞活性相比加入阻滞剂的对照组有一定程度下降,其中90 mV/mm组细胞活性下降较60 mV/mm组明显(图6A)。本课题组也对ERK通路下游基因表达进行了探究,发现加入 Ca^{2+} 离子通道阻滞剂后*FOS*和*BDNF*基因表达三组间无差异(图6B和C)。同时,又进一步探究了加入 Ca^{2+} 离子阻滞剂后ERK蛋白磷酸化的水平,发现 Ca^{2+} 离子阻滞剂抑制了ERK蛋白的磷酸化,三组间ERK蛋白磷酸化水平无差异(图6F)。故可以推断,电场刺激对661W细胞的生物学行为调控是依赖 Ca^{2+} 离子激活的ERK通路的作用。

因此在这里提出假设,一定强度的电场刺激促进 Ca^{2+} 离子内流, Ca^{2+} 离子差异水平进一步提高ERK蛋白磷酸化水平。磷酸化的ERK蛋白进一步促进CREB蛋白磷酸化,二者相互作用促进ERK通路下游与细胞存活、发育和增殖相关的*FOS*和*BDNF*基因表达上调,如此一系列级联反应促进661W细胞活性的提高和增殖比率的提高(图7)。

3 讨论

细胞对电场最明显的应答现象是对电场矢量的应

答,因此大量的研究集中于探究细胞对电场矢量性刺激的应答机制。由于对细胞外电场调控的细胞内信号转导知之甚少,所以关于细胞对电场非矢量性应答的研究也很少。同时,电场对眼睛神经细胞的影响目前还不清楚,如感光细胞对电场的应答,其分子机制完全处于空白阶段。故本研究的目的是探究视网膜感光细胞对仿生电场刺激的非矢量应答机制。因为感光细胞难以分离纯化,且体外培养时存在诸多困难,所以选择了小鼠视锥细胞来源的细胞系661W细胞作为细胞模型。本研究利用自主研发的电刺激装置来进行实验,发现60和90 mV/mm强度的电场能提高细胞活性,促进细胞增殖。本课题组发现,电场刺激能够激活 Ca^{2+} 离子依赖的ERK通路提高细胞活性,促进细胞增殖,本研究建了电刺激与ERK通路间的功能联系。

感光细胞对电场刺激非矢量性的应答分子机制究竟是什么?归根结底,还是电场改变了细胞膜的电势差和离子流,尤其是影响了 Ca^{2+} 离子流变化和细胞内的 Ca^{2+} 离子动力学的变化^[17]。 Ca^{2+} 离子对细胞的电活动和细胞内信号的转导有着重要的作用。因此猜测当模拟生理幅度的电场信号被施加后,细胞内 Ca^{2+} 离子的空间分布和游离 Ca^{2+} 离子的浓度受到了影响。本课题组的猜测与Huang等人^[18]的发现相一致,即电场可影响 Ca^{2+} 离子在细胞内的分布改变。先前的研究也报道了电场促进电压门控 Ca^{2+} 离子通道开放进而提高细胞内的游离 Ca^{2+} 离子浓度。细胞内 Ca^{2+} 离子的动力学改变进一步影响了 Ca^{2+} 离子通路相关的基因表达的改变^[19]。因此认为细胞对电场非矢量性刺激的应答源于电场影响了带电离子的运动,进而改变了细胞的电渗性,电渗的改变导致了细胞去极化,持续的去极化也对ERK通路的激活有作用^[20]。

为什么细胞持续的去极化能够激活ERK通路呢?这是由于电场刺激影响了细胞离子流,电压门控 Ca^{2+} 离子通道的开放增加,细胞内增加的游离 Ca^{2+} 离子能激活RAS/MAPK通路^[21]。同时,电场能够募集ERK蛋白向阴极方向迁移,这也能进一步促进ERK通路的激活。电场改变了细胞的 Ca^{2+} 离子分布梯度,进而促进了 Ca^{2+} 离子依赖的钙调激酶发挥作用,钙调激酶有很强的能力修饰ERK蛋白并使其磷酸化^[22,23]。这些发现也和本课题组的实验结果电场刺激能够促进ERK蛋白的磷酸化, Ca^{2+} 离子阻滞剂能够抑制ERK磷酸化相一致。磷酸化的ERK蛋白进一步穿过核膜进入细胞核以调控基因

图 5 通路分析

A: 60 mV/mm刺激组与对照组间基因表达差异火山图, 其中表达量相差2倍的基因认为有差异; B: x轴代表富集分析的P值与Q值, 其中Q值用FDR校正检验; C~F: ERK, p-ERK, CREB, p-CREB灰度分析结果, 其中60 mV/mm刺激组和90 mV/mm刺激组中p-ERK, p-CREB磷酸化水平相比于对照组上调, 同时用Image J软件对蛋白条带进行灰度分析

表达^[24], ERK蛋白同时也修饰了ERK通路下游蛋白的磷酸化, 如磷酸化的ERK蛋白是CREB蛋白磷酸化的一个重要的中间调控蛋白. 同时ERK通路负责去极化刺激晚期CREB蛋白磷酸化修饰, 进一步调控CREB磷

酸化^[24,25]. 本实验同样发现, 60和90 mV/mm电场刺激能增加ERK和CREB的磷酸化水平, 总而言之, 电场刺激调控的ERK通路相关的级联反应是细胞对电场的刺激非矢量应答过程.

图 6 电场刺激提高了ERK通路相关基因表达量, Ca^{2+} 离子通道阻滞剂逆转电场刺激的效应

A: 加入10 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 离子通道阻滞剂西尼地平后60 mV/mm刺激组和90 mV/mm刺激组细胞活性变化; B和C: 电场刺激提高FOS和BDNF基因的表达式; 加入10 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 离子通道阻滞剂西尼地平后FOS和BDNF基因的表达式三组间无差异; D和E: 电场刺激提高BDNF蛋白的表达式; F: 10 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 离子通道阻滞剂西尼地平抑制了电刺激后p-ERK的表达

本课题组同时还发现, 电场刺激促进了 Ca^{2+} 离子依赖的ERK通路下游的基因表达上调, 包括了本次着重探究的BDNF基因和FOS基因^[26,27]。其中BDNF基因调节神经细胞的生长, 增殖和分化成熟^[28]; FOS基因调控细胞的增殖, 促进细胞的存活^[29]。本研究建立了电场刺激与ERK蛋白磷酸化水平与下游基因表达量的关系。本研究也发现了合适的电场刺激能促进BDNF基因和FOS基因的表达上调, 基因的表达水平依赖于ERK和CREB的磷酸化水平。为了探究这一系列的变化是否存在 Ca^{2+} 离子依赖的效应, 加入了 Ca^{2+} 离子通道阻滞剂西尼地平进行实验, 发现 Ca^{2+} 离子通道阻滞

剂逆转了电刺激的效应, 抑制ERK蛋白的磷酸化水平, 抑制了细胞增殖, 抑制了细胞活性的提高, 抑制了BDNF基因和FOS基因表达水平的改变。此研究也证明感光细胞对电场刺激的非矢量应答存在 Ca^{2+} 离子依赖的效应。

先前的大量研究证据表明, 合适的电刺激能够延缓RCS大鼠(*Rattus norvegicus*)的感光细胞凋亡, 对遗传性视网膜变性类疾病的视网膜细胞具有保护作用^[30]。同时探究了电场刺激对唤起感光细胞的自主神经保护作用的机制, 补充了电刺激保护视网膜的分子机制。大量的研究也表明, ERK蛋白长时间的磷酸化

图 7 感光细胞对仿生电场刺激的应答机制

电场刺激促进 Ca^{2+} 离子内流, Ca^{2+} 离子差异水平进一步作用于钙调激酶, 进而提高ERK蛋白磷酸化水平. 磷酸化的ERK蛋白进一步促进CREB蛋白磷酸化, 二者相互作用促进ERK通路下游与细胞存活, 发育和增殖相关的FOS和BDNF基因表达上调, 如此一系列级联反应促进661W细胞活性的提高和增殖比率的提高

对神经细胞具有保护作用^[31]. 本研究表明, 电场刺激能促进ERK磷酸化水平的表达上调从而对感光细胞产生保护作用, 这与领域内的研究结果相符合. 先前的研究着眼于探究电刺激抑制了小胶质细胞的激活作用, 促进Müller细胞的分泌作用, 而对受损的感光细胞产生保护作用^[32], 而本课题组关注感光细胞自身对电场刺激的非矢量性应答机制, 并且发现合适的电场强度能

促进感光细胞的增殖和存活.

综上所述, 感光细胞对电场刺激的非矢量应答依赖于电场调控的 Ca^{2+} 离子的运动. 本研究为电场调控细胞内 Ca^{2+} 离子分布变化及细胞内 Ca^{2+} 离子相关的信号转导提供了新视角. 本课题组证明了电场刺激能激活 Ca^{2+} 离子依赖的ERK通路, 此通路对细胞活性的提高具有重要作用, 同时能在一定程度上促进细胞增殖.

参考文献

- 1 McCaig C D, Rajnicek A M, Song B, et al. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. *Physiol Rev*, 2005, 85: 943–978
- 2 Hotary K B, Robinson K R. Endogenous electrical currents and the resultant voltage gradients in the chick embryo. *Dev Biol*, 1990, 140: 149–160

- 3 Zhao M, Chalmers L, Cao L, et al. Electrical signaling in control of ocular cell behaviors. *Prog Retinal Eye Res*, 2012, 31: 65–88
- 4 Robinson K R. The responses of cells to electrical fields: a review. *J Cell Biol*, 1985, 101: 2023–2027
- 5 Robinson K R. Endogenous electrical current leaves the limb and prelimb region of the *Xenopus* embryo. *Dev Biol*, 1983, 97: 203–211
- 6 Zhao M, Agius-Fernandez A, Forrester J V, et al. Directed migration of corneal epithelial sheets in physiological electric fields. *Investig Ophthalmol Visual Sci*, 1996, 37: 2548–2558
- 7 Zhao M, Song B, Pu J, et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase- γ and PTEN. *Nature*, 2006, 442: 457–460
- 8 Zhao M, McCaig C D, Agius-Fernandez A, et al. Human corneal epithelial cells reorient and migrate cathodally in a small applied electric field. *Curr Eye Res*, 1997, 16: 973–984
- 9 Jaffe L F. Electrophoresis along cell membranes. *Nature*, 1977, 265: 600–602
- 10 Zhao M, Pu J, Forrester J V, et al. Membrane lipids, EGF receptors, and intracellular signals colocalize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field. *FASEB J*, 2002, 16: 857–859
- 11 Mobini S, Leppik L, Barker J H. Direct current electrical stimulation chamber for treating cells *in vitro*. *BioTechniques*, 2016, 60: 95–98
- 12 Tandon N, Marsano A, Cannizzaro C, et al. Design of electrical stimulation bioreactors for cardiac tissue engineering. Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Annual Conference, 2008, 2008: 3594–3597
- 13 al-Ubaidi M R, Font R L, Quiambao A B, et al. Bilateral retinal and brain tumors in transgenic mice expressing simian virus 40 large T antigen under control of the human interphotoreceptor retinoid-binding protein promoter. *J Cell Biol*, 1992, 119: 1681–1687
- 14 Liu S S, Zhang C, Zhang X, et al. Human umbilical cord blood-derived stromal cells: a new source of stromal cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Crit Rev Oncol/Hematol*, 2014, 90: 93–98
- 15 Jin Z B, Huang X F, Lv J N, et al. Slc7a14 linked to autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Commun*, 2014, 5: 3517
- 16 Schmitz Y, Witkovsky P. Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Neuroscience*, 1997, 78: 1209–1216
- 17 Fissore R A, Robl J M. Intracellular Ca^{2+} response of rabbit oocytes to electrical stimulation. *Mol Reprod Dev*, 1992, 32: 9–16
- 18 Huang L, Cormie P, Messerli M A, et al. The involvement of Ca^{2+} and integrins in directional responses of zebrafish keratocytes to electric fields. *J Cell Physiol*, 2009, 219: 162–172
- 19 Adams R D, Willits R K, Harkins A B. Computational modeling of neurons: intensity-duration relationship of extracellular electrical stimulation for changes in intracellular calcium. *J Neurophysiol*, 2016, 115: 602–616
- 20 Impey S, Obrietan K, Wong S T, et al. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca^{2+} stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron*, 1998, 21: 869–883
- 21 Wu G Y, Deisseroth K, Tsien R W. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 2808–2813
- 22 Schmitt J M, Wayman G A, Nozaki N, et al. Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. *J Biol Chem*, 2004, 279: 24064–24072
- 23 Wayman G A, Lee Y S, Tokumitsu H, et al. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*, 2008, 59: 914–931
- 24 Wiegert J S, Bading H. Activity-dependent calcium signaling and ERK-MAP kinases in neurons: a link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation. *Cell Calcium*, 2011, 49: 296–305
- 25 Impey S, Goodman R H. Creb signaling—timing is everything. Science’s STKE: Signal Transduction Knowledge Environment, 2001, 2001: pe1
- 26 West A E, Chen W G, Dalva M B, et al. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 11024–11031
- 27 Saito T H, Uda S, Tsuchiya T, et al. Temporal decoding of MAP kinase and CREB phosphorylation by selective immediate early gene expression. *PLoS ONE*, 2013, 8: e57037
- 28 Gonzalez A, Moya-Alvarado G, Gonzalez-Billaut C, et al. Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor. *Cytoskeleton*, 2016, 73: 612–628
- 29 Konno Y, Dong P, Xiong Y, et al. microRNA-101 targets EZH2, MCL-1 and FOS to suppress proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of aggressive endometrial cancer cells. *Oncotarget*, 2014, 5: 6049–6062
- 30 Morimoto T, Fujikado T, Choi J S, et al. Transcorneal electrical stimulation promotes the survival of photoreceptors and preserves retinal function in royal college of surgeons rats. *Investig Ophthalmol Visual Sci*, 2007, 48: 4725–4732

- 31 Chen T, Liu W, Chao X, et al. Neuroprotective effect of osthole against oxygen and glucose deprivation in rat cortical neurons: involvement of mitogen-activated protein kinase pathway. *Neuroscience*, 2011, 183: 203–211
- 32 Zhou W, Ni Y, Jin Z, et al. Electrical stimulation ameliorates light-induced photoreceptor degeneration *in vitro* via suppressing the proinflammatory effect of microglia and enhancing the neurotrophic potential of Müller cells. *Exp Neurol*, 2012, 238: 192–208

Nonvectorial responses in photoreceptor cells stimulated by electrical fields

YANG Ji^{1,2}, WANG QingFeng^{1,2}, LIN Meng^{1,2}, HE KaiWen^{1,2}, LEI XinLan^{1,2}, GAO MeiLing^{1,2}, PAN Deng^{1,2} & JIN ZiBing^{1,2}

1 Institute of Stem Cell Research; Division of Ophthalmic Genetics, The Eye Hospital, Laboratory for Stem Cell & Retinal Regeneration, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China;

2 State Key Laboratory of Ophthalmology, Optometry and Vision Science, Wenzhou 325027, China

The eye possesses various different types of electrical properties, and ocular cells are exposed to endogenous electrical fields (EFs) under natural conditions. Cellular behaviors that are regulated by EFs include vectorial (migration, orientation, and elongation) and nonvectorial responses (apoptosis and proliferation). The aim of this study was to investigate the nonvectorial responses of photoreceptor cells stimulated by EFs and to decipher the underlying molecular mechanisms. To investigate the effects of endogenous EFs on the cell behavior, we designed a customized electrical instrument that was mimetic of endogenous electrical activity. We observed that 60 and 90 mV/mm voltage gradients dramatically enhanced cell proliferation. Gene expression profiling, together with signaling pathway and gene ontology analyses, collectively demonstrated that the Ca^{2+} -dependent extracellular signal-regulated kinase pathway is involved in cellular responses to EFs. Moreover, the results of our study clearly demonstrated that EFs promote photoreceptor cell proliferation via increased Ca^{2+} influx, which subsequently activates the ERK pathway. EF stimulation affects ionic fluxes in photoreceptor cells and is an important regulator of some important aspects of photoreceptor cell behavior. In conclusion, the findings of our study offer new insights on how EFs affect intracellular Ca^{2+} , which further influences intracellular signal transduction and cell behavior.

electric, cellular behavior, ERK pathway, calcium influxes

doi: [10.1360/N052017-00243](https://doi.org/10.1360/N052017-00243)