

技术与方法

小鼠皮肤黑色素瘤细胞在三种不同基质上的趋电性比较

许琳峰¹ 赵敏^{1,2} 王晓燕¹ 赵三军^{1*}

(¹云南师范大学再生生物学实验室, 昆明 650500; ²美国加州大学戴维斯分校医学院再生治疗研究所, 加利福尼亚州 98517, 美国)

摘要 微小直流电场具有指导细胞进行定向迁移的作用。各种细胞外基质的物理、化学性质会影响细胞的迁移。该研究以小鼠皮肤黑色素瘤细胞(B16-F10)为模型, 比较微直流电场(250 mV/mm)指导下细胞在平滑基底与两种不同市售基质Matrigel及FNC上的趋电性。结果显示, 黑色素瘤细胞在三种基底上均有明显的向电场阴极迁移的趋电运动, 但在不同基质上细胞趋电的方向性无显著差异, 但细胞迁移速度及在细胞沿电场进行定向迁移的持续性有显著差异。

关键词 黑色素瘤细胞; 微直流电场; 基质; 细胞迁移

Electrotaxis of Mouse Epithelial Melanoma Cells on Three Different Matrixes

Xu Linfeng¹, Zhao Min^{1,2}, Wang Xiaoyan¹, Zhao Sanjun^{1*}

(¹Regeneration Lab, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China; ²Department of Dermatology and Department of Ophthalmology, Institute for Regenerative Cures, School of Medicine, University of California at Davis, California 98517, USA)

Abstract Directed cell migration is a crucial behavior in development, regeneration and wound healing. The small directed electric fields (EF) were proved to be one of the important direction signals to guide the cell migration. Furthermore, the physical and chemical properties of matrix would influence many aspects of the cell migration. In this study, using melanoma cell (B16-F10) as a model, we studied the electric fields guided cell migration on petri-dish, Matrigel and FNC. The results indicated that cells migrated toward cathode on each matrix, While the cells exhibited obviously different migration speed and persistence on different matrixes.

Key words melanoma cells; small directed electric fields; matrix; cell migration

细胞的定向迁移是细胞摄食、胚胎发生、个体发育、癌症转移和损伤修复等生命现象的重要基础^[1], 例如白细胞对入侵细菌和其他致病因子的追踪和吞

噬以及成纤维细胞迁移至伤口并促进愈合等。错误的迁移会导致精神发育障碍、血管疾病、肿瘤发生及恶性转移等后果^[1-5]。

收稿日期: 2013-11-29 接受日期: 2014-02-15

云南省高端科技人才引进项目(批准号: 2009CI127)、教育部留学回国人员科研启动基金资助项目和教育部春晖计划资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-65943723, E-mail: sanjunzhao@hotmail.com

Received: November 29, 2013 Accepted: February 15, 2014

This work was supported by the Yunnan Talent Recruitment Program (Grant No.2009CI127), the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars of State Education Ministry and Chunhui Plan of State Education Ministry

*Corresponding author. Tel: +86-871-65943723, E-mail: sanjunzhao@hotmail.com

网络出版时间: 2014-05-29 17:30 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0396.html>

研究表明,类似生理电场大小的外源微直流电场(small directed electric fields)具有指导细胞定向迁移的作用,该现象被称为细胞的趋电性^[6-8]。很多类型的细胞都表现出明显的趋电性。例如,晶状体上皮细胞向电场阳极方向迁移^[9],神经元细胞在电场中向阴极迁移,并且随暴露时间延长而表现出更强的趋电性^[10]。植于FNC仿生基膜上的大鼠角膜上皮细胞在150 mV/mm的电场强度下迁移速率可以达到 $20.203 \pm 0.649 \mu\text{m/h}$ ^[11]。而牛血管内皮细胞和人皮肤成纤维细胞在强度达到200 mV/mm以上时才会表现出明显的趋电性^[12-13]。近期的研究表明,内源生理性电场在促进伤口愈合的过程中具有重要作用^[14-15]。

黑色素瘤是一种恶性程度相当高的肿瘤,又称恶性黑瘤,大多原发于皮肤,早期即可发生转移^[16]。细胞外基质会影响肿瘤细胞迁移从而影响肿瘤恶性转移的过程^[3,17],它可以控制肿瘤细胞迁移的速度与方向,并为细胞迁移提供“脚手架”^[18]。细胞外基质组成成分及物理状态会影响包括肿瘤在内的细胞迁移^[17,19-20]。纤黏连蛋白可促进成上皮细胞、纤维细胞、角膜上皮细胞及黑色素细胞等的迁移^[21-23];层黏连蛋白可促进多种肿瘤细胞的迁移^[24-25]。

细胞趋电性研究目前大多集中于研究某种细胞在同一种基质上的趋电性表现,而同种细胞在不同基质上的研究相对较少。本文以小鼠黑色素瘤细胞(B16-F10)为模型,比较细胞在未经处理的平皿表面及Matrigel和FNC两种市售细胞外基质上的趋电性,为研究肿瘤细胞的迁移及微直流电场指导下的细胞迁移在肿瘤诊疗中的潜在应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠皮肤黑色素瘤细胞(B16-F10)购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

1.1.2 试剂及仪器 DMEM高糖培养基、胎牛血清FBS、0.25%胰酶和CO₂非依赖性培养基购自Gibco公司, PBS缓冲液、FNC coating mix胶原液(AthenaES公司)、Matrigel(BD公司)、高真空密封脂(Corning公司)、其他试剂均为国产分析纯,购自上海生工生物工程有限公司。

Nikon倒置显微镜(Nikon Eclipse Ti-E)、恒温培养箱(Thermo scientific公司)、5418离心机(Eppendorf

公司)、GD 100水浴锅(Grant)、BG-Power300基本电泳仪电源(北京百晶生物科技有限公司)、超净工作台(苏州净化设备有限公司)、培养皿(Corning公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠皮肤黑色素瘤细胞培养 将-70 °C超低温冰箱中保存的细胞水浴快速溶解复苏,将细胞液移入培养皿中,加入约5 mL新鲜DMEM培养基,置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中培养,每两天更换一次培养基,更换时保留少量原培养基,再加入新鲜培养基。细胞生长到对数期即可用于实验或传代培养。

1.2.2 实验细胞处理 待细胞生长到对数期,密度达到70%~80%时吸去旧培养基,用PBS缓冲液清洗两次,取200 μL 胰酶溶液铺满皿底,置于培养箱,消化3 min后吸净酶液,用新鲜培养基悬浮细胞,收集至1.5 mL离心管,2 000 r/min离心5 min,去上清液;PBS缓冲液悬浮细胞,2 000 r/min离心5 min,去上清液,重复此步骤。离心完毕后去上清,加入新鲜培养基重悬细胞,将细胞悬液移入培养皿,调整至实验所需密度。

1.2.3 基本细胞趋电性实验装置 实验装置参照Zhao等^[15,26]的方法,用高真空密封脂将两片盖玻片(长22 mm、宽11 mm、厚0.16 mm)平行固定在直径35 mm的培养皿底部中央,两玻片间隔10 mm,制作成20 mm \times 10 mm的培养室(Boyden Chamber),将细胞接种于培养室,待细胞贴壁后,以盖玻片覆盖,形成两端开放的细胞培养室,分别用高真空密封脂将两端开放的培养室与培养皿边缘连接,形成两个连通培养室的液体池。一对弯形玻璃管灌以含1.5%琼脂的Steinberg凝胶,冷却凝固后制成导电盐桥,一端与培养皿内的培养基相接触,另一端浸入含Steinberg溶液的烧杯内,其内通过Ag/AgCl电极将烧杯内的电解液与直流电源相连,形成一个完整的回路。用BG-Power300直流电源控制培养室的电压,通过万用表监测并适时调整培养室两端间电压及电场强度。

1.2.4 培养室(Boyden Chamber)处理 在实验前,分别用FNC和Matrigel两种基质处理培养室。将100 μL FNC(pH7.2)滴入培养室,均匀覆盖,30 s后吸去,用PBS缓冲液冲洗1次,再用新鲜培养基冲洗小室后均匀接种200 μL 细胞悬液($10^3/\text{mL}$),放入培养箱,待细胞贴壁后,加入新鲜培养基过夜培养12 h;4 °C恒温操作条件下将Matrigel用无血清DMEM培养基(使用前用NaHCO₃调至pH7.2)稀释100倍,取100 μL Matri-

gel稀释液均匀平铺培养室,于培养箱中静置1 h后,用PBS缓冲液冲洗1次,再用新鲜培养基冲洗小室后均匀接种200 μL 细胞悬液($10^3/\text{mL}$),盖上盖玻片,放入培养箱,待细胞贴壁后,加入新鲜培养基过夜培养。对照组不加入任何基质。

1.2.5 图像采集 利用尼康倒置显微镜NIS系统采集图像。250 mV/mm直流电场中,10倍物镜下每隔5 min采集细胞图像,持续拍摄2 h以上。

1.2.6 数据处理 随机选择运动细胞,使用ImageJ软件跟踪细胞迁移轨迹,选择细胞的标准为:(1)细胞在拍摄过程中一直存活;(2)细胞迁移轨迹没有离开视野;(3)细胞迁移过程中未接触其他细胞;(4)细胞在拍摄过程中没有分裂。

本实验用下列3种参数来表示细胞的迁移情况^[15]:

(1)方向特性= $\sum \cos\theta/n$,其中 $\cos\theta$ 是指细胞位移的直线与水平方向夹角的余弦值,当细胞迁移方向与电场方向平行时 $\cos\theta=1$ 或 -1 ,当细胞迁移方向与电场方向垂直时 $\cos\theta=0$;(2)迁移速率=细胞迁移的总路程/时间;(3)方向持续性=细胞位移路程/细胞轨迹路程,持续性数值越接近1,说明细胞在位移方向上的持续运动越强。

应用ImageJ软件追踪细胞迁移轨迹,计算分析细胞的迁移速率、趋电性、运动方向持续性等参数。使用SPSS 22.0软件对细胞迁移速度、趋电性和运动方向持续性进行统计分析。

2 结果

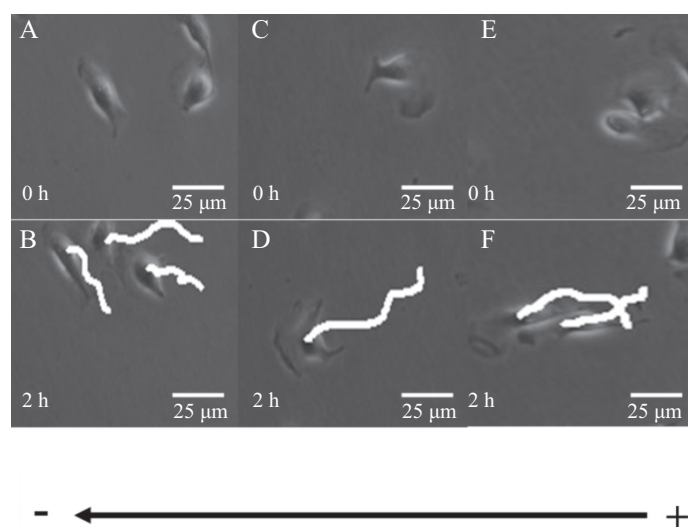
2.1 黑色素瘤细胞的贴壁状态及趋电性

将细胞悬液分别缓慢置于未经处理的皿底、经Matrigel表面处理及经过FNC表面处理的培养室(Boyden Chamber),于培养箱静置直至细胞贴壁。细胞在培养皿中贴壁时间约为5~6 h,在Matrigel上贴壁时间约为3~4 h,在FNC上的贴壁时间为2~3 h。细胞在Matrigel及FNC上伪足铺展状态明显好于光滑皿底。为保证实验时细胞状态良好,将接种上细胞的培养皿在培养箱中过夜处理。

实验前吸去旧培养液,加入新鲜并预热至37 $^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 非依赖性培养基(pH7.2),加盖玻片,置于倒置显微镜上,分别在培养小室两侧施加250 mV/mm微直流电场,通过显微镜记录细胞2 h的迁移轨迹,分析结果表明,细胞在电场中均表现出向阴极迁移的趋势(图1和图2)。

2.2 微直流电场作用下细胞在两种基质上迁移的方向性

随机选择迁移细胞,应用ImageJ软件分析,定量分析细胞在平滑基底及Matrigel和FNC两种不同细胞外基质上迁移的特性。统计结果显示,在250 mV/mm微直流电场作用下,细胞在平滑基底、Matrigel和FNC两种基质上迁移的方向性指标基本一致(图3),结果无显著差异。无细胞外基质处理的对照组细胞迁移的方向性参数为 0.947 ± 0.018 ;细胞在由Matrigel

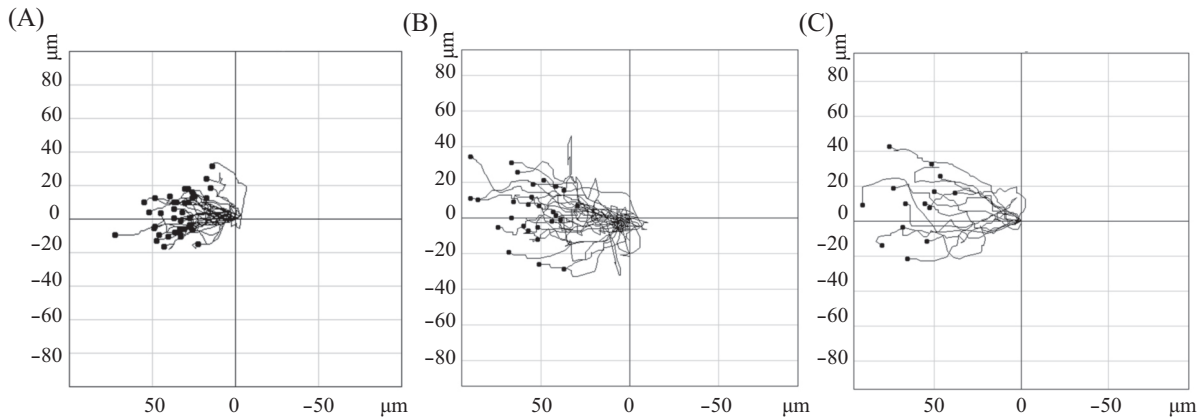


A、B: 细胞在平滑基底上0 h和2 h的瞬时位置图; C、D: 细胞在Matrigel上0 h和2 h的瞬时位置图; E、F: 细胞在FNC上0 h和2 h的瞬时位置图。

A,B: the instantaneous location map of cells on smooth base; C,D: the instantaneous location map of cells on Matrigel; E,F: the instantaneous location map of cells on FNC.

图1 250 mV/mm电场作用下细胞在不同基质表面的迁移

Fig.1 Cells migration on different matrixes in the EF (250 mV/mm)



A: 细胞在平滑基底上的迁移轨迹; B: 细胞在Matrigel上的迁移轨迹; C: 细胞在FNC上的迁移轨迹。

A: the migration trajectory of cells on smooth base; B: the migration trajectory of cells on Matrigel; C: the migration trajectory of cells on FNC.

图2 250 mV/mm电场作用下细胞在不同基质上的迁移轨迹

Fig.2 The migration trajectory of cells on different matrixes in the EF (250 mV/mm)

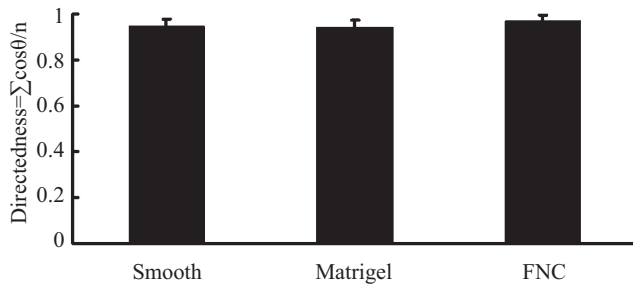


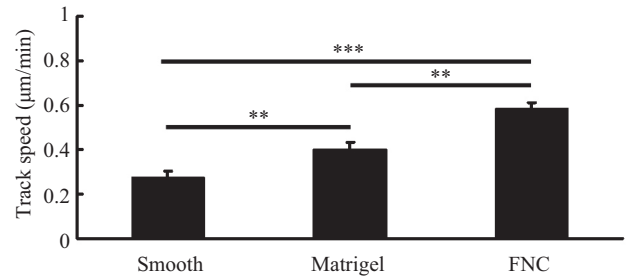
图3 250 mV/mm电场作用下细胞在不同基质上的迁移方向特性

Fig.3 The directedness of cell migration on different matrixes in the EF (250 mV/mm)

处理表面的迁移方向性为 0.941 ± 0.028 , 细胞在由FNC处理表面上迁移的方向性为 0.967 ± 0.013 。单因素方差分析显示, 差异均不显著($P > 0.05$)。

2.3 细胞的迁移速率

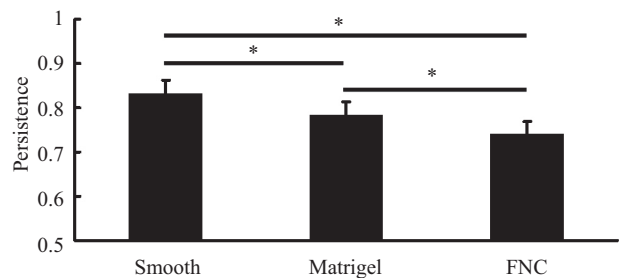
微直流电场作用下, 细胞在平滑基底、Matrigel及FNC处理表面上的迁移速率表现有所不同(图4), 细胞在培养皿表面迁移最慢, 在Matrigel上次之, 在FNC上最快。其中在对照表面, 细胞迁移速率为 $0.275 \pm 0.238 \mu\text{m}/\text{min}$; 在Matrigel上迁移速率为 $0.403 \pm 0.264 \mu\text{m}/\text{min}$; 在FNC上迁移速率为 $0.583 \pm 0.247 \mu\text{m}/\text{min}$ 。单因素方差分析显示, 细胞在Matrigel表面上的迁移速率与平滑底面相比, 差异较显著($P < 0.01$); 细胞在FNC处理的表面上迁移速率与平滑底面相比, 差异极显著($P < 0.001$); 细胞在Matrigel处理表面上的迁移速率与在FNC处理的表面上的迁移速率相比, 差异较显著($P < 0.01$)。



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图4 250 mV/mm电场作用下细胞在不同基质上的迁移速率

Fig.4 The cell migration speed on different matrixes in the EF (250 mV/mm)



* $P < 0.05$.

图5 在250 mV/mm电场作用下细胞在不同基质上的迁移方向持续性

Fig.5 The persistence of cell migration on different matrixes in the EF (250 mV/mm)

2.4 细胞在运动方向上的持续性

细胞在三种基底上运动方向的持续性如图5所示, 细胞在平滑基底上运动方向持续性值为 0.832 ± 0.075 , 细胞在Matrigel上运动方向持续性值为 0.783 ± 0.083 , 在FNC上迁移方向持续性值为

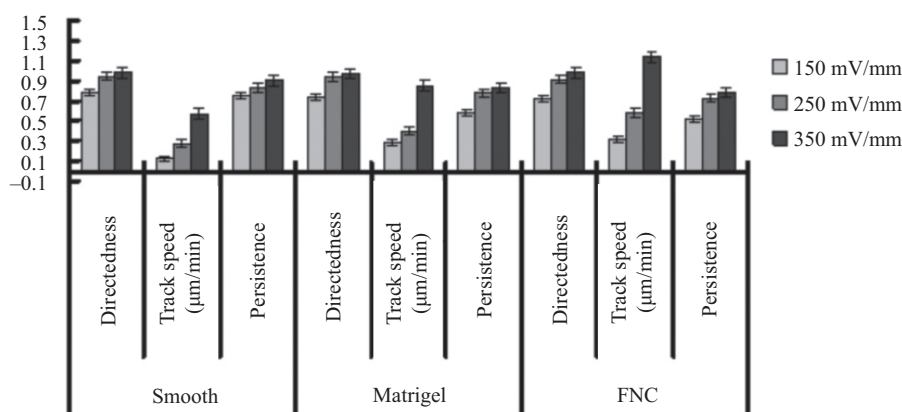


图6 细胞在不同大小电场中的迁移的参数情况

Fig.6 Cell migration in different EFs

0.739±0.087。细胞迁移方向持续性表现为在培养皿表面最好, Matrigel次之, FNC上最差。统计分析显示, 在Matrigel与FNC的基质表面上细胞迁移方向持续性与对照组比较均有显著差异($P<0.05$); 细胞在Matrigel上与FNC上迁移方向持续性相比差异也显著($P<0.05$)。

2.5 电场强度对细胞迁移的影响

为进一步了解电场强度对细胞在不同基质迁移的影响, 我们比较了细胞在150 mV/mm、250 mV/mm及350 mV/mm三种电场强度下的迁移。结果表明, 细胞在几种基质上迁移的方向性、迁移速度及在迁移方向持续性均随电场强度的增大而增加(图6)。

3 讨论

在无电场的情况下, 小鼠黑色素瘤细胞迁移极缓慢, 且无明显方向性。在微直流电场作用下, 黑色素瘤细胞在培养皿表面、Matrigel及FNC表面均表现出明显的趋电性。通过对比细胞在150 mV/mm、250 mV/mm及350 mV/mm电场强度下的迁移, 我们发现, 细胞在几种基质表面的迁移方向性、迁移速度及迁移方向的持续性上均随电场强度增加而增强。该现象表明, 在一定的电场强度下, 细胞迁移方向会受到电场信号的指导, 且趋电性与电压强度呈正相关。该结果与Guo等^[12]应用人表皮成纤维细胞进行趋电性的研究结果一致。

本研究结果显示, 在不同的基质表面, 细胞的趋电反应的方向性无显著差异。导致该现象的原因可能是在一定的电场强度下, 细胞对方向性的响应在一定范围内只与方向性信号的强弱有关, 与细胞

所附着的基质性质无显著关系。我们的研究表明, 在不同基质上, 细胞迁移的速率及其在电场方向上迁移的持续性有显著差异。在本实验中所使用的培养皿表面为共价结合水凝胶层, 具有亲水性和电荷中性; Matrigel主要成分是层黏连蛋白、IV型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白, 还包含生长因子和基质金属蛋白酶等。Matrigel在室温条件下聚合形成具有生物学活性的三维基质, 模拟体内细胞基底膜的结构、组成、物理特性和功能, 其稀释3倍以上时在支撑物表面仅形成一层蛋白质的薄层^[27]。FNC主要成分是纤连蛋白、胶原蛋白和牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)^[28], 基底的形状与细胞外基质类似, 产生较平滑的表面^[29]。McKee等^[30]研究人大动脉和脐动脉内皮细胞对仿生基膜的反应时也观察到细胞在仿生基膜上的迁移速度明显要比平滑基底快。细胞外基质的物理化学性质包括形态都会影响细胞的迁移, 此外, 硬度也是影响细胞迁移的重要因素^[31]。本研究所用三种表面的化学组成成分及物理性质有较大差异, 可能导致细胞表面的蛋白分子与基质表面成分的结合程度有差异。同时, 各基质表面形态有所差异, 也是影响细胞迁移速度及迁移方向的持续性的可能因素。

通过对黑色素瘤细胞在不同基质上趋电性的实验发现, 细胞在不同基质表面的趋电性无显著差异, 但其迁移速度及迁移方向的持续性有显著差异。这表明, 细胞外基质的物理化学性质对指引细胞发生定向迁移的方向性信号无影响, 但是对细胞迁移速度及细胞在电信号作用下迁移的持续性会产生影响。

细胞的趋电性研究发现, 电场信号在伤口愈合过

程中是指导细胞向伤口中心迁移从而实现伤口愈合的优先信号^[32]。微直流电场可作为潜在的用于促进伤口治疗的有效方式。本研究为利用各类基质与微直流电场共同作用促进伤口修复提供了科学参考。

参考文献 (References)

- 1 Franz CM, Jones GE, Ridley AJ. Cell migration in development and disease. *Dev Cell* 2002; 2(2): 153-8.
- 2 Ludgate ME, Ratanachaiyavong S, Weetman AP, Hall R, McGregor AM. Failure to demonstrate cell-mediated immune responses to thyroid antigens in Graves' disease using *in vitro* assays of lymphokine-mediated migration inhibition. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60(1): 98-102.
- 3 Peter F, Yael H, Miriam T. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 441-9.
- 4 Courtneidge SA. Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins. *Biochem Soc Trans* 2012; 40(1): 129-32.
- 5 Roque M, Reis ED, Roig E. Role of smooth muscle cell migration and proliferation in allograft vascular disease. *Transplant Proc* 2002; 34(1): 333-4.
- 6 Nuccitelli R, Erickson CA. Embryonic cell motility can be guided by physiological electric fields. *Exp Cell Res* 1983; 147(1): 195-201.
- 7 Robinson KR. The Responses of Cells to Electrical Fields. *J Cell Biol* 1985; 101(6): 2023-7.
- 8 Nishimura KY, Isseroff RR, Nuccitelli R. Human keratinocytes migrate to the negative pole in direct current electric fields comparable to those measured in mammalian wounds. *J Cell Sci* 1996; 109: 199-207.
- 9 Entong W, Forrester JV, Mccaig CD. Re-orientation and faster, directed migration of lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 2000; 71: 91-8.
- 10 Yao L, McCaig CD, Zhao M. Electrical signals polarize neuronal organelles, direct neuron migration, and orient cell division. *Hippocampus* 2009; 19(9): 855-68.
- 11 Zhao M, Fernandez AA, Forrester JV, Mccaig CD. Orientation and directed migration of cultured corneal epithelial cells in small. *J Cell Sci* 1996; 109: 1405-14.
- 12 Guo A, Song B, Reid B, Gu Y, Forrester JV, Jahoda CA, *et al.* Effects of physiological electric fields on migration of human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2010; 130(9): 2320-7.
- 13 Li X, John K. Effects of direct current electric fields on cell migration and actin filament distribution in bovine vascular endothelial cells. *J Vasc Res* 2002; 39: 391-404.
- 14 Zhao M, Song B, Pu J, Wada T, Reid B, Tai G, *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase- γ and PTEN. *Nature* 2006; 442(7101): 457-60.
- 15 Song B, Gu Y, Pu J, Reid B, Zhao Z, Zhao M. Application of direct current electric fields to cells and tissues *in vitro* and modulation of wound electric field *in vivo*. *Nature Protocols* 2007; 2(6): 1479-89.
- 16 Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355(1): 51-65.
- 17 Pathak A, Kumar S. Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(26): 10334-9.
- 18 Raines EW. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: Relationships to vascular disease. *Int J Exp Pathol* 2000; 81(3): 173-82.
- 19 Pathak A, Kumar S. Transforming potential and matrix stiffness co-regulate confinement sensitivity of tumor cell migration. *Integr Biol (Camb)* 2013; 5(8): 1067-75.
- 20 Zaman MH, Trapani LM, Sieminski AL, Mackellar D, Gong H, Kamm RD, *et al.* Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(29): 10889-94.
- 21 Pulaganti M, Banaganapalli B, Mulakayala C, Chitta SK, C M A. Molecular modeling and docking studies of O-succinylbenzoate synthase of *M. tuberculosis*—a potential target for antituberculosis drug design. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 172(3): 1407-32.
- 22 Takano N, Kawakami T, Kawa Y, Asano M, Watabe H, Ito M, *et al.* Fibronectin combined with stem cell factor plays an important role in melanocyte proliferation, differentiation and migration in cultured mouse neural crest cells. *Pigment Cell Res* 2002; 15(3): 192-200.
- 23 Clark RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 1982; 79(5): 264-9.
- 24 Pouliot N, Kusuma N. Laminin-511: A multi-functional adhesion protein regulating cell migration, tumor invasion and metastasis. *Cell Adh Migr* 2013; 7(1): 142-9.
- 25 Yudoh K, Matsui H, Kanamori M, Ohmori K, Tsuji H. Tumor cell attachment to laminin promotes degradation of the extracellular matrix and cell migration in high-metastatic clone cells of RCT sarcoma *in vitro*. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86(7): 685-90.
- 26 Zhao M, Fernandez AA, Forrester JV, McCaig CD. Orientation and directed migration of cultured corneal epithelial cells in small electric fields are serum dependent. *J Cell Sci* 1996; 109: 1405-14.
- 27 Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 2005; 15(5): 378-86.
- 28 Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453(7193): 314-21.
- 29 Raghunathan V, McKee C, Cheung W, Naik R, Nealey PF, Russell P, *et al.* Influence of extracellular matrix proteins and substratum topography on corneal epithelial cell alignment and migration. *Tissue Eng Part A* 2013; 19(15/16): 1713-22.
- 30 McKee CT, Wood JA, Ly I, Russell P, Murphy CJ. The influence of a biologically relevant substratum topography on human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Biophys J* 2012; 102(5): 1224-33.
- 31 Kumar S, Pathak A. Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(26): 10334-9.
- 32 Zhao M. Electrical fields in wound healing—An overriding signal that directs cell migration. *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20(6): 674-82.