

外源微直流电场对肺腺癌细胞Calu-3迁移的影响

李 莎^{1,2} 王晓燕^{1,2} 赵三军^{1,2} 高润池^{1,2} 赵 敏^{1,3} 施利民^{1,2*}

(¹云南师范大学生命科学学院, 昆明 650500; ²生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 昆明 650500;

³美国加州大学戴维斯分校医学院, 加州 95616, 美国)

摘要 该文通过Time-lapse技术, 以无电场作用的人肺腺癌细胞Calu-3细胞为对照组, 以分别暴露于电场强度为2 V/cm、4 V/cm和6 V/cm的Calu-3细胞为实验组, 研究了外源微直流电场对Calu-3迁移的影响。结果表明, Calu-3细胞可通过单细胞和群体细胞两种形式迁移, 直流电场对这两种迁移形式具有显著的影响: 无电场作用时, 单细胞和群体性的Calu-3随机迁移; 加入直流电场后, 单细胞和群体性的Calu-3朝向负极定向迁移, 迁移方向性指数、迁移方向持续性指数、轨迹速度、位移速度显著高于无电场作用的对照组。电场强度为4 V/cm时, 单细胞和群体性的Calu-3趋电性最明显, 迁移方向最恒定。相同强度的电场作用下, Calu-3群体细胞迁移的方向性指数和方向持续性均高于单细胞迁移, 但单细胞迁移的轨迹速度和位移速度快于群体细胞迁移。

关键词 肺腺癌细胞Calu-3; 直流电场; 单细胞迁移; 群体细胞迁移; 趋电性

The Effect of Exogenous Direct Current Electric Fields on Migration of Lung Adenocarcinoma Cell Line Calu-3

Li Sha^{1,2}, Wang Xiaoyan^{1,2}, Zhao Sanjun^{1,2}, Gao Runchi^{1,2}, Zhao Min^{1,3}, Shi Limin^{1,2*}

(¹School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China;

²Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming 650500, China; ³School of Medicine, University of California at Davis, California 95616, USA)

Abstract We analyzed the effect of direct current electric fields (dc EFs) on lung adenocarcinoma cells Calu-3 through Time-lapse microscopy. The cells without electric field were taken as the control group. The cells of experimental group were exposed to dc EFs with intensity of 2 V/cm, 4 V/cm and 6 V/cm, respectively. The cells of Calu-3 migrated through two way, including isolated cells and clustered cells. Our data showed that dc EFs had important effect on the migrations of Calu-3. Both isolated cells and clustered cells of Calu-3 moved randomly in the absence of an EF. In the presence of dc EFs with different strengths, both the two type cells migrated toward the cathode electrode of electric field. The parameters of migration ability, including directedness index, persistence index, track speed and displacement speed had significant differences between control and experimental groups. Generally, the dc EFs mad Calu-3 cells possess more obvious directional ability and faster speed. Both isolated and clustered cells achieved maximal electrotaxis in 4 V/cm EFs. The clustered cells of Calu-3 exhibited greater sensitivity to dc EFs but ran more slowly than the isolated cells under EFs with same strength.

收稿日期: 2017-03-14

接受日期: 2017-05-26

国家自然科学基金-云南省联合基金(批准号: U1132603)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB518100)、云南省应用基础研究青年项目(批准号: 2012FD021)、教育部工程中心开放基金和国家自然科学基金(批准号: 81660519)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-65943723, E-mail: shilm281@aliyun.com

Received: March 14, 2017

Accepted: May 26, 2017

This work was supported by the Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China & Yunnan Province (Grant No.U1132603), the National Basic Research Program of China (Grant No.2012CB518100), Yunnan Basic Research for Young Project (Grant No.2012FD021), the Open Fund of the Ministry of Education Engineering Center and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81660519)

*Corresponding author. Tel: +86-871-65943723, E-mail: shilm281@aliyun.com

网络出版时间: 2017-07-25 16:26:27

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170725.1626.008.html>

Keywords lung cancer Calu-3; direct current electric field; isolated cell migration; clustered cell migration; electrotaxis

转移是导致癌症低存活率及各种诊疗技术失效的首要原因^[1],而肿瘤细胞的迁移能力则是肿瘤转移最关键的影响因素^[2-5]。肿瘤细胞的定向迁移是肿瘤从原发病灶转移至远端组织和器官的主要途径。引导细胞定向迁移的导航信息繁多而复杂,如化学因素^[6]、物理因素(如机械力)^[7]、生物因素(如生物电场)^[8]和药物制剂^[9]等。自18世纪发现广泛存在于生物体内的内源性电场以后,许多在体或离体实验结果表明,电信号在细胞迁移中具有指导作用,多种细胞具有明显的趋电性(electrotaxis/galvanotaxis),即电场作用下,细胞趋向电场负极或正极迁移,且在多种导航信号共同存在的情况下,电信号对细胞迁移的指导作用优于其他信号^[10]。

有关肺癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、口腔鳞状细胞癌等研究结果均提示了电信号在指导肿瘤细胞定向迁移中的重要作用^[7-9,11]。首先,正常组织及病变部位之间存在电势差,这种电压梯度可能指导肿瘤细胞定向转移;第二,通过模拟内源生物电场的离体实验证明,多种肿瘤细胞(如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、口腔鳞状细胞癌)等具有趋电性,且不同类型及转移能力不同的肿瘤细胞具有截然不同的趋电反应;第三,肿瘤细胞趋电迁移过程中,生物电信号可调控多条与细胞定向迁移能力密切相关的信号通路^[12-13];第四,在肺癌细胞中,电信号指导细胞的运动器官——伪足集中朝向电场负极分布,促使肺癌细胞相应的趋向电场负极迁移^[14]。然而,目前国内外对微小直流电场影响肿瘤细胞迁移机制研究的深入程度与其重要的生理意义不成正比,尤其是在国内,相关的研究较为缺乏,目前仅见闫晓龙等^[15-18]研究了微直流电场对肺癌细胞A549单细胞迁移、凋亡及细胞周期的影响。

肿瘤细胞可通过单细胞迁移^[14]、细胞流^[19]、膨胀性生长^[20]等多种方式迁移,不同的迁移方式在肿瘤转移中的作用可能也各不相同。目前,绝大多数研究集中于探讨单细胞迁移在肿瘤转移过程的作用及机制。因此,为了全面揭示肿瘤细胞转移的机制,亟需对肿瘤转移过程中出现的其他迁移方式进行深入研究。群体迁移是生物体内一种复杂而广泛存在的细胞运动方式^[21-22],在胚胎神经胚层发育^[23]、乳腺腺体

及管道发育^[24]、血管内皮发育^[25]等很多正常生理活动过程中,细胞群体迁移的频率仅次于单细胞迁移。而在小叶乳腺癌、上皮性前列腺癌、大细胞肺癌等多种高转移度的癌症中鲜见单细胞迁移,群体迁移才是肿瘤细胞实现淋巴转移及血行转移最主要的途径,且肿瘤转移的活跃度与肿瘤细胞群体转移直接相关,其转移效率高于单细胞转移^[26-28]。

目前,肺癌是全球发病率上升最快、致死率最高的肿瘤,中国的肺癌发生率居世界首位,其中非小细胞肺癌发病率最高,而非小细胞肺癌中又以肺腺癌的发病率为最高^[29]。肺腺癌细胞Calu-3同时具有单细胞和群体细胞两种迁移方式,因此,本研究以Calu-3作为研究对象。生物体内产生的内源性电场是稳定的直流电。然而,由于一些客观条件的限制,通过在体实验研究细胞趋电性难度较大。随着实验技术的发展,通过特定装置施加外源性电场可高度模拟和还原活体条件下的内源性生理电场。其中,较为成熟的加电装置是细胞趋电性小室^[30]。因此,本实验通过细胞趋电性小室向Calu-3细胞施加外源性微直流电场,并量化对比分析电场对Calu-3细胞不同迁移方式的影响,以期用电诊疗技术在肿瘤治疗中的应用提供一定的参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞 人肺腺癌细胞株Calu-3购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 MEM培养基、0.25%胰蛋白酶消化液、胎牛血清FBS、双抗、CO₂非依赖型培养基、FNC coating mix均购自于Gibco公司;PBS缓冲液、高真空密封脂购自Corning公司。

1.1.3 主要仪器 主要仪器有:超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)、5418离心机(Eppendorf公司)、恒温培养箱(Thermo Scientific公司)、培养皿(Corning公司)、GD100水浴锅(英国Grant公司)、Nikon倒置显微镜(Nikon Eclipse Ti-E)以及BG-Power 300电泳仪电源(北京百晶生物科技有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 人肺腺癌细胞Calu-3的培养及处理 Calu-3

的培养过程: 将保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中的Calu-3细胞取出, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中快速融解复苏, 并将细胞液均匀地散布在装有4 mL MEM培养基的培养皿(60 mm)中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含5% CO_2 的恒温培养箱中培养。待细胞贴壁后将培养皿中的培养基弃去, 加入新鲜培养基, 放回恒温培养箱中继续培养。每隔2 d更换一次培养基, 待细胞生长到对数期时即可传代培养。两代之后细胞状态良好时即可用于实验。

1.2.2 细胞趋电性实验装置 细胞趋电性小室制作参照Zhao等^[31]的方法, 趋电性实验装置基本结构如图1所示。在直径为100 mm的培养皿底部中央, 制作长为22 mm、宽为10 mm的长方形小室。将盖玻片(长22 mm、宽10 mm、厚0.13 mm)一分为二, 使用高真空密封脂将盖玻片固定于小室长边两侧。将实验细胞种于两端开放的培养室(Boyden chamber), 待实验前将小室用完整盖玻片覆盖小室上方。随后, 使用高真空密封脂加盖于小室宽边两端, 以防加入的培养基漫过, 从而形成两端连通培养室的液体池。在一对U形玻璃管中灌以含有1.5%的Steinberg凝胶, 待凝固后作为导电盐桥, 一端侵入含有Steinberg溶液的烧杯中, 另一端接触培养皿中的培养基。通过Ag/AgCl电极将烧杯内的电解液与直流电源相通, 形成完整回路。使用万用表每间隔20 min实时监测小室两端电压一次。

1.2.3 细胞迁移实验 当Calu-3细胞生长至对数期, 密度达到80%左右时, 吸去原有的培养基, 用PBS缓冲液2 mL清洗2次后加入2 mL胰蛋白酶消化液, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含5% CO_2 的培养箱中消化5~6 min后取出, 吸净胰蛋白酶消化液加入新鲜培养基, 吹打至细胞悬

浮。将细胞悬液转移至1.5 mL离心管中, 1 000 r/min离心3 min, 弃去上清液, 加入新鲜培养基, 反复吹打使细胞悬浮, 取少量悬浮细胞液置于培养皿或离心管中, 加入新鲜培养基调整其密度至 $5\times 10^4/\text{cm}^2$ 。取200 μL 细胞悬液接种于趋电小室中过夜培养, 待用。

进行细胞迁移实验时, 将趋电小室中的MEM培养基更换为 CO_2 非依赖型培养基。实验过程中, 以无电场作用的Calu-3细胞为对照组(即电场强度为0 V/cm), 以接受强度为2 V/cm、4 V/cm和6 V/cm直流电场作用的Calu-3细胞为实验组, 各组细胞在Nikon倒置显微镜(Nikon Eclipse Ti-E)下持续观察3 h。

1.2.4 图像采集 实验过程中, 使用Nikon倒置显微镜NIS系统采集图像。图像采集模式为相衬(Phase contrast), 10倍物镜下连续拍摄3 h, 每间隔5 min采集一帧细胞迁移图像, 共采集37张图片。

1.2.5 图像分析 使用Image J 1.48(National Institute of Health, NIH)软件中的M track J插件跟踪并数字化细胞的迁移轨迹。根据该数字化信息, 使用Chemotaxis Tool插件获取Avi格式的细胞迁移轨迹视频、Tiff格式的细胞运动轨迹图片及细胞空间位移距离Excel表, 根据此表计算细胞轨迹速度、细胞位移速度、运动方向持续性及方向性指数4个参数用以量化Calu-3细胞的迁移能力。4个参数的具体计算公式如下: 轨迹速度(track speed, TS)=细胞轨迹路程/总时间, 位移速度(displacement speed, DS)=位移路程/总时间, 方向持续性(persistence index, PI)=细胞位移路程/细胞轨迹路程, 方向性指数(directedness index, DI)= $\sum \cos\theta/n$ 。其中, $\cos\theta$ 值是细胞位移的直线方向与水平电场方向夹角的余弦值, 当 $\cos\theta=0$ 表

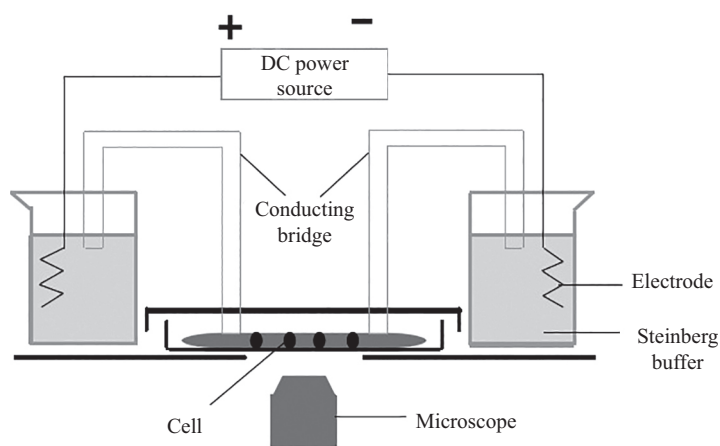


图1 加电装置示意图

Fig.1 The sketch map of the EF application

示细胞迁移方向垂直于电场方向, $\cos\theta$ 值=1或-1时表示细胞迁移方向平行于水平方向或电场方向。

为了确定细胞迁移方向与电场方向之间的关系, 分析中以细胞迁移起点和终点的相对位置来确定细胞迁移的方向: 若细胞迁移的终点相对于起点更靠近电场正极, 则定义为该细胞朝向电场正极迁移; 反之, 若细胞迁移的终点相对于起点更靠近电场负极, 则定义为该细胞朝向电场负极迁移。基于该标准, 计算不同电场强度下Calu-3单细胞或群体细胞朝向电场负极运动的比例。

1.2.6 统计分析 为确保实验的可重复性, 每种条件的实验进行3次平行实验, 每次实验至少采集5个视野的图像。使用SPSS 22.0软件(IBM)计算细胞迁移的4个参数的平均值, 并以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 表示。通过单因素方差分析检验电场对Calu-3单细胞迁移及群体细胞迁移的影响; 通过独立样本 t 检验分析同一电场强度下Calu-3单细胞迁移及群体细胞迁移之间的差异。 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 分别表示统计学显著性水平、较显著水平和极显著水平。

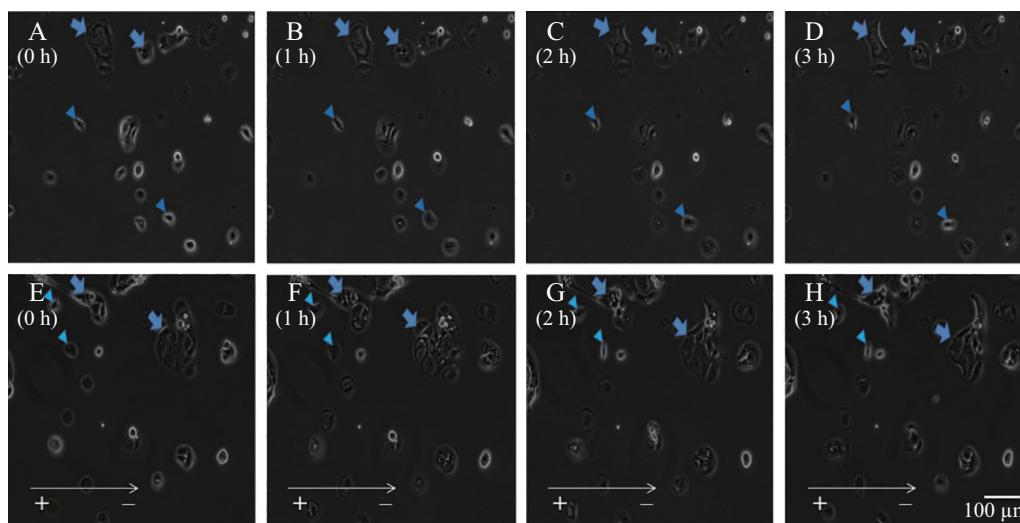
2 结果

实验中观察到, Calu-3可通过单细胞或多个细胞聚集在一起形成的群体细胞进行迁移。群体迁移过程中, Calu-3细胞数量介于2~54个之间(图2)。

2.1 Calu-3单细胞具有趋电性

无电场作用时, Calu-3的单细胞随机迁移, 无明显的趋向性($DI = -0.03 \pm 0.08$)。施加外源电场后, Calu-3的单细胞表现出趋电性, 即从随机迁移逐渐变为朝向电场负极迁移(图3A~图3D)。

单因素方差分析结果亦显示, 施加电场前后, Calu-3单细胞的趋电性指数具有明显差异。具体为: 电场强度为2 V/cm时, 53.85%的细胞朝向电场负极运动, 但趋电性指数($DI = 0.10 \pm 0.10$)与对照组之间无显著差异($P = 0.19$)(表1和图4A)。当电场强度增加至4 V/cm时, 朝向电场负极迁移的细胞增加至77.47%, 趋电性最为明显($DI = 0.50 \pm 0.08$), 且显著高于对照组($P < 0.001$)。当电压增加至6 V/cm后, 65.28%的细胞趋向电场负极迁移, 趋电性($DI = 0.20 \pm 0.09$)与电场强度为4 V/cm相比呈不显著性减弱($P = 0.08$), 但其朝向电场负极运动的趋势仍然显著高于对照组($P < 0.05$)。与之相应, 电场对Calu-3单细胞迁移方向的影响呈现出相同的趋势(图3A~图3D、图4A): 无电场作用时, Calu-3细胞频繁改变迁移方向, 故对照组单细胞迁移的迁移方向一致性最低($PI = 0.64 \pm 0.03$)。施加电场后, Calu-3单细胞的迁移方向逐渐稳定, 而在强度为4 V/cm电场作用下, Calu-3单细胞迁移的方向持续性最稳定(2 V/cm: $PI = 0.69 \pm 0.03$; 4 V/cm: $PI = 0.72 \pm 0.02$; 6 V/cm: $PI = 0.65 \pm 0.03$), 其迁移方向的稳

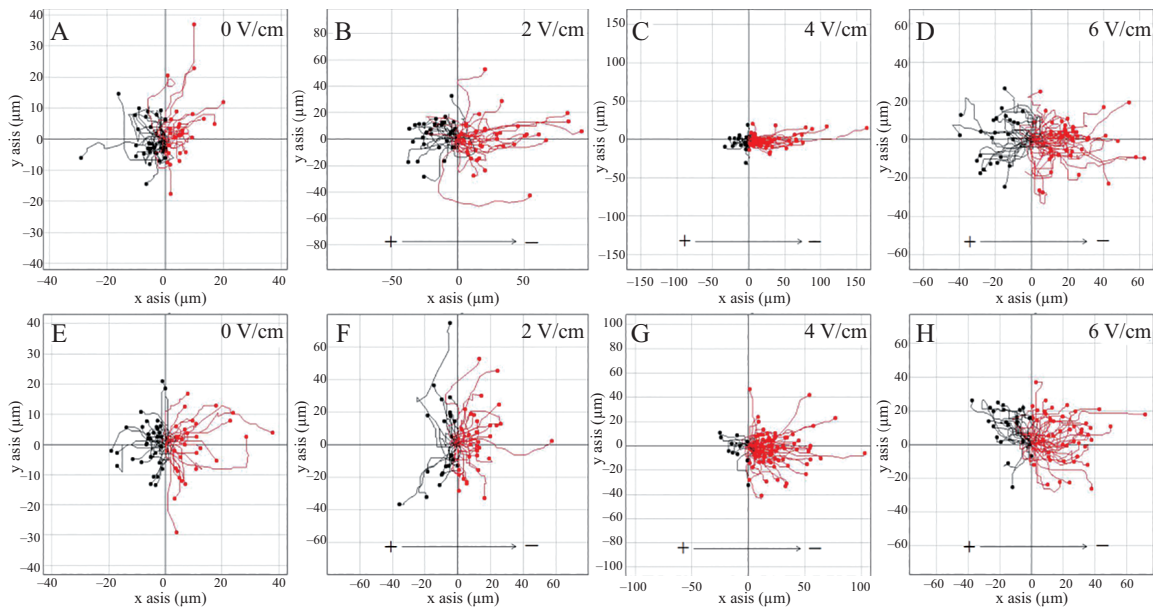


A~D: Calu-3在电场强度为0 V/cm时0~3 h的瞬时位置图; E~H: Calu-3在电场强度为4 V/cm时0~3 h的瞬时位置图(图中白色箭头标识电场方向为左正右负)。蓝色三角形指示Calu-3单细胞, 蓝色箭头指示Calu-3群体细胞。

A~D and E~H are Calu-3 in absence and 4 V/cm dc EFs at time 0 h, 1 h, 2 h and 3 h, respectively. White arrows represent the orientation of dc EFs. In all cases, the anode is in the left, and cathode is in the right. Triangles and blue arrows indicate the isolated cells and clustered cells, respectively.

图2 Calu-3单细胞迁移和群体细胞迁移示意图

Fig.2 The schematics of the isolated migration and clustered migration of Calu-3



A~D: Calu-3在电场强度分别为0 V/cm、2 V/cm、4 V/cm、6 V/cm外源性微直流电场中单细胞迁移的迁移轨迹; E~H: Calu-3在电场强度分别为0 V/cm、2 V/cm、4 V/cm、6 V/cm外源性微直流电场中群体性迁移的迁移轨迹。箭头标识电场方向, 左侧为阳极, 右侧为阴极。
A-D and E-H are migration trajectories of isolated and clustered Calu-3 cells in 0 V/cm, 2 V/cm, 4 V/cm and 6 V/cm dc EFs at time, respectively. Black arrows represent the orientation of dc EFs. In all cases, the anode is in the left, and cathode is in the right.

图3 Calu-3单细胞迁移及群体细胞迁移的轨迹
Fig.3 The migration trajectory of isolated cells and clustered cells of Calu-3

表1 不同电场强度下Calu-3单细胞迁移与群体细胞迁移的趋向性比较
Table 1 The comparisons on directional ability of isolated and clustered Calu-3 cells

电场强度(V/cm) EF strange (V/cm)	单细胞 Isolated cell		群体细胞 Clustered cell	
	样本量 Sample size	趋向负极细胞比例(%) The ratio of cells to the cathode (%)	样本量 Sample size	趋向负极细胞比例(%) The ratio of cells to the cathode (%)
0	64	53.13	66	55.00
2	65	53.85	60	61.67
4	71	77.47	63	93.65
6	72	65.28	63	68.25

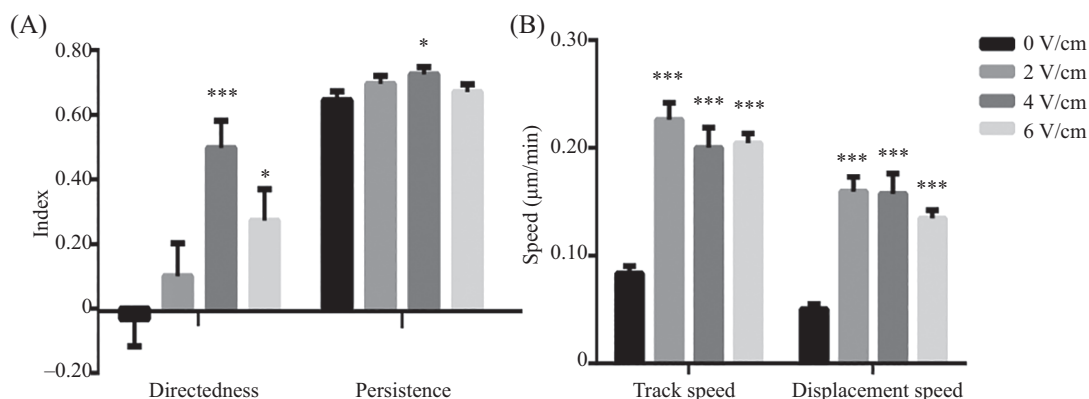
定性显著高于对照组(2 V/cm vs 0 V/cm, $P=0.17$; 4 V/cm vs 0 V/cm, $P=0.03$; 6 V/cm vs 0 V/cm, $P=0.48$)。

单因素方差分析结果显示, 电场可显著加快Calu-3单细胞的迁移速度(图4B)。因此, 与对照组相比, 各实验组细胞的迁移范围扩大。同时, Calu-3单细胞的迁移路径逐渐从多次转弯变为直接朝向负极运动(图3A~图3D)。受到2 V/cm、4 V/cm及6 V/cm的电场作用后, 各实验组的Calu-3单细胞的轨迹速度及位移速度均显著加快。电压强度为2 V/cm时, Calu-3单细胞具有最快的轨迹速度(0 V/cm vs 2 V/cm: $0.08\pm0.01\text{ }\mu\text{m/min}$ vs $0.24\pm0.02\text{ }\mu\text{m/min}$, $P<0.001$)和位移速度(0 V/cm vs 2 V/cm: $0.05\pm0.01\text{ }\mu\text{m/min}$ vs $0.17\pm0.01\text{ }\mu\text{m/min}$, $P<0.001$)。而当电压增强至4 V/cm

和6 V/cm时, Calu-3单细胞迁移的轨迹速度(4 V/cm: $0.20\pm0.02\text{ }\mu\text{m/min}$; 6 V/cm: $0.20\pm0.01\text{ }\mu\text{m/min}$)和位移速度(4 V/cm: $0.16\pm0.02\text{ }\mu\text{m/min}$; 6 V/cm: $0.13\pm0.01\text{ }\mu\text{m/min}$)较之电压为2 V/cm时虽略有下降(图4B), 但仍显著快于对照组(0 V/cm vs 4 V/cm: $P<0.001$; 0 V/cm vs 6 V/cm: $P<0.001$)。

2.2 Calu-3群体细胞具有趋电性

Calu-3群体迁移对电场的反应与Calu-3单细胞一致: 无电场作用时, Calu-3群体细胞随机迁移; 施加电场后, Calu-3群体细胞逐渐转变为朝向电场负极定向迁移(图3E~图3H)。单因素方差分析结果显示: 外源电场作用下, Calu-3群体细胞的趋电性指数明显高于无电场作用时的对照组(图5A)。电场强度

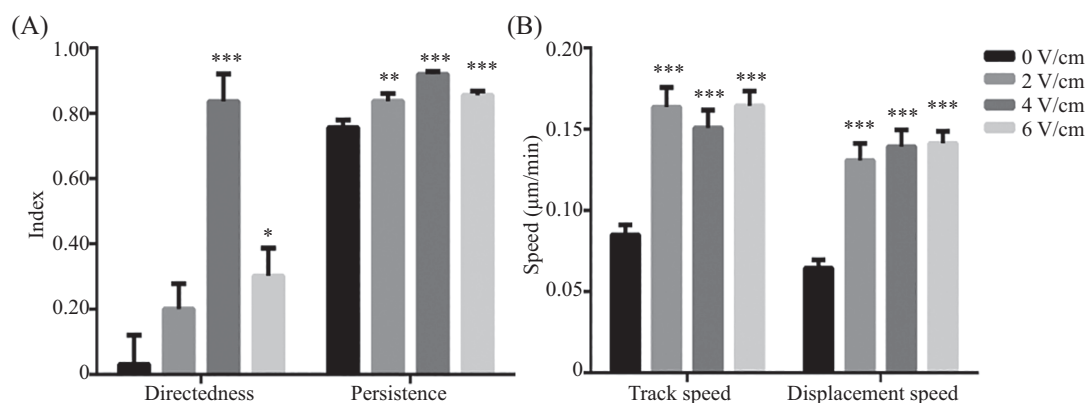


A: 在电场强度分别为0 V/cm、2 V/cm、4 V/cm、6 V/cm外源性微直流电场中Calu-3单细胞迁移的方向性指数及方向持续性指数的比较; B: 在电场强度分别为0 V/cm、2 V/cm、4 V/cm、6 V/cm外源性微直流电场中Calu-3单细胞迁移的轨迹速度及位移速度的比较。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 各实验组(加电)与对照组(不加电)相比较。

A: the comparisons on directedness index and persistence index of isolated Calu-3 cells under dc EFs with strength 0 V/cm, 2 V/cm, 4 V/cm, 6 V/cm; B: the comparisons on track speed and displacement speed of isolated Calu-3 cells under dc EFs with strength 0 V/cm, 2 V/cm, 4 V/cm, 6 V/cm. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ compared with control group (0 V/cm).

图4 不同电压强度下Calu-3单细胞迁移特征的比较

Fig.4 The comparisons on migration ability of isolated Calu-3 cells under different electrical strength



A: 在电场强度分别为0 V/cm、2 V/cm、4 V/cm、6 V/cm外源性微直流电场中Calu-3群体细胞迁移的方向性指数及方向持续性指数的比较; B: 在电场强度分别为0 V/cm、2 V/cm、4 V/cm、6 V/cm外源性微直流电场中Calu-3群体细胞迁移的轨迹速度及位移速度的比较。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 各实验组(加电)与对照组(不加电)相比较。

A: the comparisons on directedness index and persistence index of clustered Calu-3 cells under dc EFs with strength 0 V/cm, 2 V/cm, 4 V/cm, 6 V/cm; B: the comparisons on track speed and displacement speed of clustered Calu-3 cells under dc EFs with strength 0 V/cm, 2 V/cm, 4 V/cm, 6 V/cm. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with control group (0 V/cm).

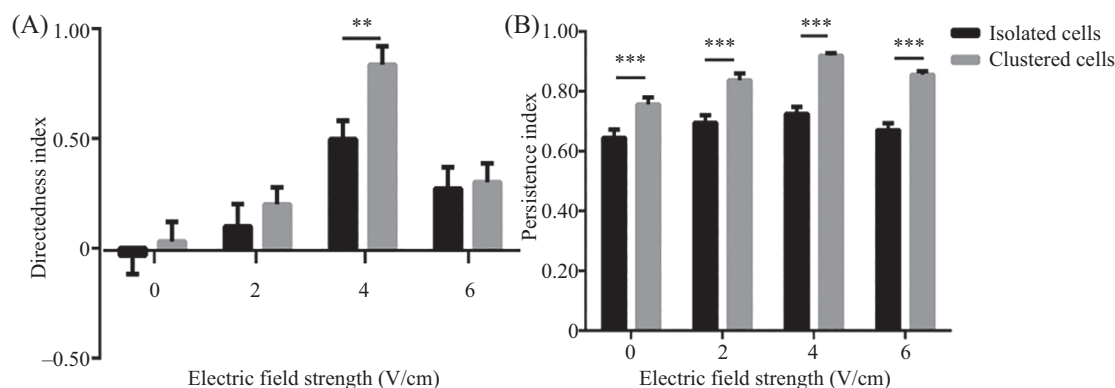
图5 不同电压强度下Calu-3群体细胞迁移特征的比较

Fig.5 The comparisons on migration ability of clustered Calu-3 cells under different electrical strength

为2 V/cm时, 趋电性指数高于对照组但无显著差异 (2 V/cm vs 0 V/cm: 0.21 ± 0.08 vs 0.03 ± 0.09 , $P=0.11$), 其中, 61.67%的群体细胞朝向电场负极迁移(表1)。电场强度达到4 V/cm时, 趋电性最强($DI=0.84\pm0.05$)且显著高于对照组($P<0.001$), 趋向电场负极迁移的细胞增加至93.65%。当电压强度增至6 V/cm时, 趋电性较4 V/cm有所下降($DI=0.30\pm0.09$), 但显著高于对照组($P<0.05$), 其中, 朝向电场负极迁移的细胞数量减少至68.25%。Calu-3群体细胞迁移的方向持续性也出现同样变化, 无电场作用下Calu-3群体细胞迁

移方向稳定性差($PI=0.76\pm0.02$), 细胞群频繁变化迁移方向。施加电场后, 实验组Calu-3群体细胞迁移方向持续性明显高于对照组(2 V/cm: $PI=0.84\pm0.02$, $P=0.001$; 4 V/cm: $PI=0.92\pm0.01$, $P<0.001$; 6 V/cm: $PI=0.86\pm0.01$, $P<0.001$), 其中, 以电压强度为4 V/cm时, Calu-3群体细胞方向持续性最为稳定(图5A)。

与Calu-3单细胞迁移相比, Calu-3群体细胞迁移轨迹较为平直, 转弯次数较少(图3E~图3H)。依单因素方差分析可知, 与Calu-3单细胞迁移速度变化趋势一致, 施加外源电场可显著加快Calu-3群



A: 在电场强度分别为0 V/cm、2 V/cm、4 V/cm、6 V/cm外源性微直流电场中Calu-3单细胞迁移和群体细胞迁移的方向性指数的比较; B: 在电场强度分别为0 V/cm、2 V/cm、4 V/cm、6 V/cm外源性微直流电场中Calu-3单细胞迁移和群体细胞迁移方向持续性指数的比较。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: the comparisons on directedness index between isolated and clustered Calu-3 cells under dc EFs with strength 0 V/cm, 2 V/cm, 4 V/cm, 6 V/cm; B: the comparisons on persistence index between isolated and clustered Calu-3 cells under dc EFs with strength 0 V/cm, 2 V/cm, 4 V/cm, 6 V/cm. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图6 不同电压强度下Calu-3单细胞迁移和群体细胞迁移方向性指数和方向持续性的比较

Fig.6 The comparisons on directedness index and persistence index between isolated and clustered Calu-3 cells under different electrical strength

体细胞的迁移速度(图5B)。无电场作用时, Calu-3群体细胞的迁移速度最慢($TS=0.08\pm0.01\ \mu\text{m}/\text{min}$, $DS=0.06\pm0.01\ \mu\text{m}/\text{min}$)。当电场强度为2 V/cm时, Calu-3群体细胞迁移速度逐渐开始增加, 且显著快于对照组($TS=0.16\pm0.01\ \mu\text{m}/\text{min}$, $P<0.001$; $DS=0.13\pm0.01\ \mu\text{m}/\text{min}$, $P<0.001$)。电场强度增强至4 V/cm时, Calu-3群体细胞的迁移速度较之2 V/cm时无显著变化($TS=0.15\pm0.01\ \mu\text{m}/\text{min}$, $P=0.55$; $DS=0.14\pm0.01\ \mu\text{m}/\text{min}$, $P=0.66$), 但显著快于对照组。当电压增至6 V/cm时, Calu-3群体细胞的迁移速度达到最大值($TS=0.16\pm0.01\ \mu\text{m}/\text{min}$, $DS=0.14\pm0.01\ \mu\text{m}/\text{min}$)。

2.3 Calu-3细胞做群体迁移时趋电性强但迁移速度慢

虽然Calu-3单细胞迁移和群体细胞迁移过程中响应电场的趋势类似, 但二者的具体迁移特征存在差别。关于二者趋电能力的独立样本 t 检验结果显示: 无论有无电场作用, Calu-3群体迁移时的趋向性均比单细胞迁移时明显, 其中, 电压强度为4 V/cm时, 二者趋电性的差异达到极显著水平($P<0.01$, 图6A)。同时, Calu-3群体细胞迁移过程中方向持续性指数均显著高于单细胞迁移(2 V/cm: $P<0.001$; 4 V/cm: $P<0.001$; 6 V/cm: $P<0.001$), 表明Calu-3群体迁移比单细胞迁移具有更加恒定的迁移方向(图6B)。

针对Calu-3单细胞迁移和群体迁移速度的独立样本 t 检验结果表明, Calu-3群体细胞迁移时速度较

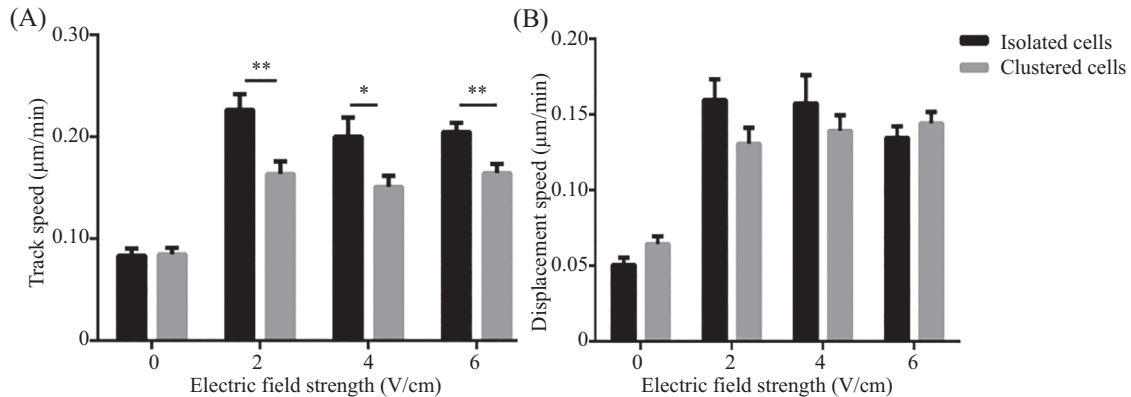
慢, 具体如下。Calu-3的单细胞和群体细胞在无电场作用时, 轨迹速度和位移速度均无显著差异。施加电场后, 除6 V/cm电场作用时, Calu-3群体细胞位移速度略快于单细胞之外, 其余强度电场作用时, Calu-3群体细胞的轨迹速度及位移速度均慢于单细胞迁移的Calu-3, 其中, 二者的轨迹速度差异均为显著(图7, 2 V/cm: $P=0.01$; 4 V/cm: $P=0.03$; 6 V/cm: $P=0.001$)。

3 讨论

3.1 电场影响了Calu-3的迁移能力

在肿瘤细胞中开展的研究仅见于肺癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、口腔鳞状细胞癌中, 且均只关注了电场对单细胞迁移的影响, 本文为电场对肿瘤细胞迁移的影响提供了重要补充。

在本研究中, Calu-3细胞在单细胞迁移及群体细胞迁移过程中, 电场均会使其从无明确迁移方向的随机迁移改变为朝向电场负极定向迁移, 在加快细胞迁移速度的同时促使细胞保持稳定的迁移方向。上述结果表明, 首先, 电场显著影响了Calu-3细胞的迁移能力, Calu-3的趋电迁移异于无导航信号作用时的随机迁移模式, 暗示了当正常组织与癌变组织之间的电势差、肿瘤微环境内生物电场发生异变时, 可能会导致肿瘤细胞的定向转移。其次, 此前的研究结果均只证实了电场影响了肿瘤细胞的单细胞迁移, 我们的研究则证实了电场亦可作用于肿瘤



A: 在电场强度分别为0 V/cm、2 V/cm、4 V/cm、6 V/cm外源性微直流电场中Calu-3单细胞迁移和群体细胞迁移的轨迹速度的比较; B: 在电场强度分别为0 V/cm、2 V/cm、4 V/cm、6 V/cm外源性微直流电场中Calu-3单细胞迁移和群体细胞迁移的位移速度的比较。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
A: the comparisons on track speed between isolated and clustered Calu-3 cells under dc EFs with strength 0 V/cm, 2 V/cm, 4 V/cm, 6 V/cm; B: the comparisons on displacement speed between isolated and clustered Calu-3 cells under dc EFs with strength 0 V/cm, 2 V/cm, 4 V/cm, 6 V/cm. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图7 不同电压强度下Calu-3单细胞迁移和群体细胞迁移速度的比较

Fig.7 The comparisons on track speed and displacement speed between isolated and clustered Calu-3 cells under different electrical strength

细胞的群体迁移。单细胞迁移和群体细胞迁移是肿瘤细胞迁移主要的途径,而电场对这两种迁移方式均有影响,暗示了电信号在肿瘤细胞转移调控中可能具有重要作用。同时,肺腺癌细胞中,除了本研究中的Calu-3细胞具有趋电性之外,目前的研究显示,A549和CL1-5^[32]两种肺腺癌亦具有趋电性。这些肺腺癌细胞虽然来源、遗传学背景、转移潜能均不相同,但都可响应电信号作定向迁移,说明趋电性是肺腺癌细胞普遍具有的生理特性。

针对电场对A549、CL1-0、CL1-5单细胞迁移影响的研究结果表明,肺腺癌细胞对电场响应与其转移潜能相关^[32]。例如,高转移潜能的CL1-5朝向电场阳极迁移,而中转移潜能的A549则朝向电场负极迁移,低转移潜能的CL1-0则对电场无明显响应。虽然A549和CL1-5均具有趋电性,但是可能由于其转移潜能和遗传背景不同,因此,具体参与其趋电反应的信号通路、离子通道可能各不相同,最终导致其具有不同的趋电反应。本研究所用的Calu-3其转移潜能介于低到中度之间,故其在电场中的迁移方向与中转移潜能的A549相同,均朝向电场负极迁移。肺腺癌细胞在电场中的迁移速度亦与其转移潜能相关,转移潜能越高,则迁移速度越快。与CL1-5及A549相比,Calu-3单细胞在电场中的迁移速度较慢,这可能是由于Calu-3的转移潜能低于上述两种肺腺癌细胞。此外,虽然这4种细胞均属于肺腺癌细胞,但其遗传背景不同、不同的实验中种植细胞的基底

及硬度不同等因素均可影响细胞迁移速度。

虽然电场可引导更多的Calu-3单细胞和群体细胞以更快的速度、更稳定的方向持续性朝向电场负极定向迁移,但Calu-3的单细胞和群体细胞在趋电迁移过程中,其迁移能力并未表现出明显的电场强度依赖性。Calu-3单细胞迁移和群体细胞迁移的趋电性指数、迁移方向持续性指数、朝向负极运动细胞占比3个参数在电场强度从2 V/cm增强至4 V/cm时达到最大值,当电场强度增至6 V/cm时则开始下降;迁移速度则在电场强度为2 V/cm时最快,当电场强度增至4 V/cm和6 V/cm时速度减慢。我们推测,该现象的成因是一定强度范围内的电场可影响细胞内部与趋电性相关信号通路及蛋白,促使Calu-3趋电能力增强。但电场强度增加至一定程度后,超出了Calu-3细胞对电场的生理承受阈值,破坏了相关的信号通路,最终导致细胞趋电能力减弱。

3.2 Calu-3细胞群体迁移并非单细胞迁移的简单聚合

目前,对单细胞和群体细胞趋电性迁移的研究仅在两种正常体细胞——乳腺上皮细胞^[33]和犬肾细胞^[34]中开展。这些研究结果显示:相比单细胞迁移,群体细胞迁移对电场方向敏感度更高。即便无电场作用时,群体细胞亦表现出定向迁移的趋势。相应地,群体细胞的迁移方向稳定性更高,这样有利于群体细胞持续朝向特定的电场方向迁移。另一方面,由于群体细胞迁移方向较为恒定,故其需要调整迁

移方向时, 调整速度较慢, 耗时较长, 从而群体细胞的迁移速度低于单细胞。虽然肿瘤细胞的生理特征区别于正常体细胞, 但我们的研究结果证实了肺腺癌细胞Calu-3两种不同形式趋电迁移之间的差异与正常体细胞相同, 即群体性Calu-3细胞对电场负极的敏感度更高, 主要表现为群体性Calu-3细胞具有更高的趋电性指数、迁移方向持续性指数及朝向负极运动的细胞比例更高。但是, 群体性Calu-3细胞的迁移速度较慢, 尤其是轨迹速度均显著慢于单细胞。这可能是由于单细胞运动灵活性较高, 相同时间内迁移轨迹相对较长, 故迁移速度更快。综上, 无论是正常细胞或肿瘤细胞, 电场对它们的两种迁移方式均产生影响, 但是影响的具体指标不同: 电场对群体细胞迁移的主要影响为其显著提升了群体细胞的迁移方向性指数和方向持续性指数; 而对单细胞迁移的主要影响则表现为电场显著加快了单细胞的轨迹速度和位移速度。

根据对正常体细胞单细胞和群体细胞趋电性机制的研究结果可知, 这两种迁移方式存在差异的原因如下: 首先, 群体细胞趋电迁移过程中, 多个细胞组成一个功能整体, 其中涉及到了复杂的胞间作用, 如胞间黏连、胞间信号复合物^[35]以及细胞牵引力等, 而单细胞迁移涉及到的胞间作用则相对简单; 其次, 伪足作为细胞迁移的运动器官, 伪足性状发生改变会影响细胞迁移的速度、方向、持续性和运动轨迹, 从而对细胞运动起到决定性作用^[36-37]。伪足的形成是多种肌动蛋白、蛋白质受体及细胞骨架变化导致的, 而电场诱导效应会使得细胞骨架及组成伪足的肌动蛋白发生变化。单细胞趋电迁移时, 伪足的生长不受空间的制约, 而群体细胞迁移过程中由于细胞间接触抑制以及受空间缺乏的约束难以延伸出伪足^[38], 这可能是导致单细胞趋电迁移和群体细胞趋电迁移存在差异的原因之一。

3.3 研究展望

内源性电场普遍存在于生物体中, 且经体外模拟内源性电场发现, 绝大多数细胞均具有趋电性。然而, 目前对正常细胞趋电性研究较多, 肿瘤细胞趋电性研究则仅在有限种类中开展, 这严重限制了对肿瘤细胞转移机制的全面认识。同时, 肿瘤细胞趋电性迁移的研究集中于单细胞迁移, 而对肿瘤转移的主要途径——群体细胞迁移研究十分缺乏。本实验通过对比研究肺腺癌细胞Calu-3单细胞和群体细

胞趋电性, 可为揭示肺腺癌细胞转移机制提供重要补充和参考。但是, 本实验的研究对象种类较为单一, 今后的研究中应增加肺癌细胞的种类, 以期揭示趋电性在肺癌细胞中的广泛性。

电场作用下细胞迁移涉及的机制颇为复杂, 其具体机制目前还不清楚, 但是相关的研究表明, 一些分子机制参与细胞趋电性。首先, 电场作用下细胞膜电位去极化, 直接激活电压门控离子通道(如 Ca^{2+} 、 Na^{+} 通道)或电压敏感蛋白^[39-42]。其次, 电场作用下细胞膜组分的不对称分布^[43]。细胞膜组分的不对称分布会促使与导航信号传递相关的细胞信号发生极化^[31]。细胞膜组分可以分为4类: 细胞膜受体、离子通道、激酶受体及整联蛋白, 目前被报道过与细胞趋电性相关的胞内信号联级反应包括PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)、cAMP(cyclic adenosine monophosphate)、PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)、ERK1/2(extracellular signal-regulated protein kinases 1/2)及钙信号通路等^[13,44-47]。此外, 细胞外环境也是影响细胞趋电性的因素, 如细胞外基质^[48]与血清^[49]。关于群体细胞趋电性迁移机制的研究, 则显示了细胞间钙黏蛋白是群体细胞趋电迁移的基础^[50]。本文对细胞趋电性迁移的研究仅限于现象的描述, 后续还需要借助细胞与分子生物学技术对其机制进行深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Seton-Rogers S. Metastasis: Opposing forces in invasion. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(9): 624-5.
- 2 Backus J, Laughlin T, Wang Y, Belly R, White R, Baden J, *et al*. Identification and characterization of optimal gene expression markers for detection of breast cancer metastasis. *J Mol Diagn* 2005; 7(3): 327-36.
- 3 Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* 2010; 112(1): 3-25.
- 4 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917): 860-7.
- 5 Gray RS, Cheung KJ, Ewald AJ. Cellular mechanisms regulating epithelial morphogenesis and cancer invasion. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(5): 640-50.
- 6 Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8): 563-72.
- 7 Djamgoz MBA, Mycielska M, Madeja Z, Fraser SP, Korohoda W. Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: Involvement of voltage-gated Na^{+} channel activity. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 14): 2697-705.

- 8 Tsai HF, Peng SW, Wu CY, Chang HF, Cheng JY. Electrotaxis of oral squamous cell carcinoma cells in a multiple-electric-field chip with uniform flow field. *Biomicrofluidics* 2012; 6(3): 34116.
- 9 Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, *et al.* Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005; 11(15): 5381-9.
- 10 Song HJ, Poo MM. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9(3): 355-63.
- 11 Wang CC, Kao YC, Chi PY, Huang CW, Lin JY, Chou CF, *et al.* Asymmetric cancer-cell filopodium growth induced by electric-fields in a microfluidic culture chip. *Lab Chip* 2011; 11(4): 695-9.
- 12 Vanhaesebroeck B. Charging the batteries to heal wounds through PI3K. *Nat Chem Biol* 2006; 2(9): 453-5.
- 13 Zhao M, Song B, Pu J, Wada T, Reid B, Tai G, *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature* 2006; 442(7101): 457-60.
- 14 Sanz-Moreno V, Marshall CJ. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(5): 690-6.
- 15 闫小龙, 韩 静, 张志培, 汪 健, 倪云峰, 高坤祥, 等. 直流电场对肺癌细胞移行及Integrin $\beta 1$ 的影响. *中国肺癌杂志* (Yan Xiaolong, Han Jing, Zhang Zhipei, Wang Jian, Ni Yunfeng, Gao Kunxiang, *et al.* The effect of dcEFs on migration behavior of A549 cells and Integrin $\beta 1$ expression. *Chinese Journal of Lung Cancer*) 2008; 11(2): 178-82.
- 16 闫小龙, 韩 静, 张志培, 汪 健, 徐 钡, 周 兰, 等. 表皮生长因子促进肺癌细胞在直流电场中定向移行的实验研究. *中华肿瘤防治杂志* (Yan Xiaolong, Han Jing, Zhang Zhipei, Wang Jian, Xu Hong, Zhou Lan, *et al.* Enhancement of EGF to the directed migration of cultured A549 cells in direct-current electric fields. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*) 2008; 15(8): 561-4.
- 17 闫小龙, 韩 静, 汪 健, 朱以芳, 倪云峰, 高坤祥, 等. 生理范围直流电场对肺癌细胞凋亡及细胞周期影响的观察. *中华肿瘤防治杂志* (Yan Xiaolong, Han Jing, Wang Jian, Zhu Yifang, Ni Yunfeng, Gao Kunxiang, *et al.* Physiological range direct-current electric fields effect on apoptosis and cell cycle of lung cancer cells. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*) 2011; 18(13): 985-8.
- 18 闫小龙, 韩 静, 张志培, 王云杰, 汪 健, 徐 钡, 等. 肺癌A549细胞在直流电场中定向移行的研究. *现代肿瘤医学* (Yan Xiaolong, Han Jing, Zhang Zhipei, Wang Yunjie, Wang Jian, Xu Hong, *et al.* Directed migration of cultured A549 cells in direct-current electric field. *Journal of Modern Oncology*) 2008; 16(5): 707-10.
- 19 Garcia GL, Rericha EC, Heger CD, Goldsmith PK, Parent CA. The group migration of dictyostelium cells is regulated by extracellular chemoattractant degradation. *Mol Biol Cell* 2009; 20(14): 3295-304.
- 20 Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A. Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(8): 573-87.
- 21 Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2012; 14(8): 777-83.
- 22 Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(5): 362-74.
- 23 Davidson LA, Keller RE. Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. *Development* 1999; 126(20): 4547-56.
- 24 Simian M, Hirai Y, Navre M, Werb Z, Lochter A, Bissell MJ. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* 2001; 128(16): 3117-31.
- 25 Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F, Quax PH, Van LN, Grimbergen J, *et al.* Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood* 2003; 101(5): 1810-7.
- 26 Bell CD, Waizbard E. Variability of cell size in primary and metastatic human breast carcinoma. *Invasion Metastasis* 1986; 6(1): 11-20.
- 27 Byers SW, Sommers CL, Hoxter B, Mercurio AM, Tozeren A. Role of E-cadherin in the response of tumor cell aggregates to lymphatic, venous and arterial flow: Measurement of cell-cell adhesion strength. *J Cell Sci* 1995; 108(Pt 5): 2053-64.
- 28 Fisher CJ, Egan MK, Smith P, Wicks K, Millis RR, Fentiman IS. Histopathology of breast cancer in relation to age. *Br J Cancer* 1997; 75(4): 593-6.
- 29 王少强, 程远大, 何志伟, 周卧龙, 高 阳, 段朝军, 等. 蛋白激酶A调节亚基1 α 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义. *中南大学学报(医学版)* (Wang Shaoqiang, Cheng Yuanda, He Zhiwei, Zhou Wolong, Gao Yang, Duan Chaojun, *et al.* PRKAR1 α expression in non-small cell lung cancer and its clinicopathologic significance. *Journal of Central South University, Medical Sciences*) 2016; 41(11): 1148-54.
- 30 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*. *Nat Protoc* 2007; 2(6): 1479-89.
- 31 McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, Zhao M. Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential. *Physiological Rev* 2005; 85(3): 943-78.
- 32 Sun YS, Peng SW, Lin KH, Cheng JY. Electrotaxis of lung cancer cells in ordered three-dimensional scaffolds. *Biomicrofluidics* 2012; 6(1): 14102.
- 33 Lalli ML, Asthagiri AR. Collective migration exhibits greater sensitivity but slower dynamics of alignment to applied electric fields. *Cell Mol Bioeng* 2015; 8(2): 247-57.
- 34 Ikari A, Takiguchi A, Atomi K, Sato T, Sugatani J. Decrease in claudin-2 expression enhances cell migration in renal epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Physiol* 2011; 226(6): 1471-8.
- 35 Li L, Hartley R, Reiss B, Sun Y, Pu J, Wu D, *et al.* E-cadherin plays an essential role in collective directional migration of large epithelial sheets. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(16): 2779-89.
- 36 Andrew N, Insall RH. Chemotaxis in shallow gradients is mediated independently of PtdIns 3-kinase by biased choices between random protrusions. *Nat Cell Biol* 2007; 9(2): 193-200.
- 37 Bosgraaf L, van Haastert PJ. The ordered extension of pseudopodia by amoeboid cells in the absence of external cues. *PLoS One* 2009; 4(4): e5253.
- 38 Merks RM, Perryn ED, Shirinifard A, Glazier JA. Contact-inhibited chemotaxis in de novo and sprouting blood-vessel growth. *PLoS Comput Biol* 2008; 4(9): e1000163.
- 39 Grimes JA, Djamgoz MB. Electrophysiological characterization

- of voltage-gated Na^+ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. *J Cell Physiol* 1998; 175(1): 50-8.
- 40 Özkucur N, Monsees TK, Perike S, Do HQ, Funk RHW. Local calcium elevation and cell elongation initiate guided motility in electrically stimulated osteoblast-like cells. *PLoS One* 2009; 4(7): e6131.
- 41 Trollinger DR, Isseroff RR, Nuccitelli R. Calcium channel blockers inhibit galvanotaxis in human keratinocytes. *J Cell Physiol* 2002; 193(1): 1-9.
- 42 Sakata S, Hossain MI, Okamura Y. Coupling of the phosphatase activity of Ci-VSP to its voltage sensor activity over the entire range of voltage sensitivity. *J Physiol* 2011; 589(Pt 11): 2687-705.
- 43 Poo MM, Robinson KR. Electrophoresis of concanavalin A receptors along embryonic muscle cell membrane. *Nature* 1977; 265(5595): 602-5.
- 44 Pullar CE, Isseroff RR. Cyclic AMP mediates keratinocyte directional migration in an electric field. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 9): 2023-34.
- 45 Wang E, Zhao M, Forrester JV, Mccaig CD. Electric fields and MAP kinase signaling can regulate early wound healing in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(1): 244-9.
- 46 Meng X, Arocena M, Penninger J, Gage FH, Zhao M, Song B. PI3K mediated electrotaxis of embryonic and adult neural progenitor cells in the presence of growth factors. *Exp Neurol* 2011; 227(1): 210-7.
- 47 Pullar CE, Isseroff RR, Nuccitelli R. Cyclic AMP-dependent protein kinase A plays a role in the directed migration of human keratinocytes in a DC electric field. *Cytoskeleton* 2001; 50(4): 207-17.
- 48 Zhao Z, Watt C, Karystinou A, Roelofs AJ, Mccaig CD, Gibson IR, *et al.* Directed migration of human bone marrow mesenchymal stem cells in a physiological direct current electric field. *Eur Cell Mater* 2011; 22: 344-58.
- 49 Zhao M, Agius-Fernandez A, 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(Pt 6): 1405-14.
- 50 Wu J, Lin F. Recent developments in electrotaxis assays. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014; 3(2): 149-55.