

弱极低频磁场对 Actin 骨架组装效率的 频率窗口效应初探*

杜娟¹⁾ 吴霞^{1, 2, 3)} 齐红新¹⁾ 宋维涛¹⁾ 王志丹¹⁾

饶凌月¹⁾ 张三军³⁾ 陈树德¹⁾ 夏若虹^{1, 2, 3)**}

¹⁾ 华东师范大学物理系生物物理实验室, 上海 200241; ²⁾ 华东师范大学物理系光学实验室, 上海 200241;

³⁾ 华东师范大学精密光谱科学与技术国家重点实验室, 上海 200062

摘要 前期研究发现, 50 Hz 弱磁场辐照能明显降低细胞的微丝含量和组装效率, 对 actin 骨架形态也有明显影响. 电磁生物学效应是否与辐照场频率相关, 一直受到研究者的关注. 单体球状肌动蛋白(G-actin)是带电结构, 电磁场频率会影响其振荡频率并对微丝聚合效率产生影响. 本文从细胞骨架形态和蛋白质两层次, 采用免疫荧光技术考察 0.4 mT, 在 35~140 Hz 范围内 5 个频率的极低频磁场(ELF-MF)对 FL 细胞中纤维状肌动蛋白(F-actin)含量的影响, 并采用荧光共振能量转移技术(FRET)验证效应最明显的频率对离体 G-actin 组装效率的干扰程度. 结果显示, 相比假辐照组, 细胞中 F-actin 含量在 50 Hz 辐照组下降了(34.66±3.14)%, 110 Hz 次之, 而另外 3 组(35、70 和 140 Hz)无显著性差异. 同时利用 FRET 方法验证, 在 50 Hz 磁场辐照下, 离体环境中 G-actin 组装成 F-actin 的效率较假辐照组、35 和 70 Hz 组显著降低. 经初步分析, G-actin 在弱 ELF-MF 中受到以洛伦兹力和感生电场力的合力为主的相关电磁力干扰, 致使组装效率下降, 且由于工频磁场周期与微丝组装周期的特殊相干性, 在 50 Hz 频率附近可能存在一个外磁场干扰 actin 骨架组装的频率窗口.

关键词 工频磁场, 磁场频率, G-actin, F-actin, 洛伦兹力, 感生电场力

学科分类号 Q64

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0131

家用电器通常使用频率为 50 Hz 或 60 Hz 的交流电, 它们所产生的环境工频磁场(power frequency magnetic field, PFMF)属于极低频磁场(extremely low frequency magnetic field, ELF-MF, 0~300 Hz)^[1]. 由于家用电器以及电子产品广泛和密集的使用, 人们经常身处于 PFMF 中, 因此, 长期暴露于 PFMF 是否会诱发人体相关的病理学效应, 已成为公共卫生领域深切关注的课题. 20 世纪 90 年代, 瑞典科学家经过对 43 万常年居住在高压输电线周围的居民进行调查后明确指出, 电磁波与脑瘤和儿童白血病有直接关系, 目前瑞典政府已确认强度在 0.2 μ T 以上的低频磁场对人体会产生有害的影响^[2]. 1998 年, 美国国家环境卫生审查组对接触 60 Hz 电磁场的生物健康效应的科学证据上, 达成共识: 应将电磁场看作是可疑的人类致癌源(possible human carcinogen)^[3]. 因此, 越来越多的关注聚焦于工频

磁场引发疾病的原理.

生物组织能够介导外磁场对生物体的影响^[4], 虽然弱 ELF-MF 通常在生物体内不引起明显的热效应, 但却可能通过影响细胞内的信号转导机制对细胞内部的生理活动发挥作用^[5]. 弱 ELF-MF 作为微弱的物理信号, 要引起生物体明显的生物效应需要生物系统接收物理信号并将其转换为生物信号, 该转换过程通常在细胞膜受体上进行. 研究表明, 细胞膜上的某些受体可以感受到特定的电磁信号并被激活, 电磁信号因此经由信号转导系统进入细胞内, 并被逐级放大, 微小的物理信号因此被转换为

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2011CB503703).

** 通讯联系人.

Tel: 021-54342955, E-mail: xiaruohong@163.com

收稿日期: 2015-04-30, 接受日期: 2015-07-07

强度足够大的生物信号, 引起生物效应, 并可能对遗传物质产生影响^[6-7].

细胞骨架系统是细胞的重要组成部分, 在维持细胞形态、爬行和迁移、胞吞及胞吐、信号转导等细胞的正常生理活动中起着重要的作用, 高度激活的细胞骨架是肿瘤细胞的特性之一. 细胞骨架主要包括微丝、微管和中间纤维三大部分. 其中, 微丝是构成伪足、应力纤维和黏连结构的主要成分, 在真核细胞中, 由单体球状肌动蛋白(global actin, G-actin)聚合而成, 在细胞质中呈束状平行排列或者疏散的网状排列, 且这两种形式同时存在, 处于正端聚集 - 负端解聚的动态平衡. 细胞骨架的结构与细胞内外的信息传递交换有关. 涉及到细胞外基质 - 质膜 - 细胞骨架连续体信号传递途径, 与细胞内外物质的运输也有密切联系, 因此研究电磁场对细胞骨架的影响对研究环境电磁辐射如何影响人类健康有重要意义.

赵晋等^[8]以及我们的前期研究^[9]发现, 在配体 EGF 缺失的情况下, 经 0.2 mT 或 0.4 mT PFMF 辐照, 人羊膜上皮细胞(FL 细胞)和中国仓鼠肺细胞(CHL 细胞)微丝骨架形态均发生了明显变化, 主要表现为细胞应力纤维解聚和细胞中空化, 肌动蛋白(actin)聚合成应力纤维的效率明显下降, 同时自由 actin 浓度上升, 而边缘纤维状肌动蛋白(F-actin)细胞骨架增多增粗, 并在细胞边缘向外生成片状伪足和丝状伪足, 黏连斑明显增多, 该现象在短时间辐照的 30 min 组最为明显, 且在相同辐照时间时, 0.4 mT 磁场辐照作用更为明显. 在 CHL 细胞上也观察到 PFMF 导致细胞生长因子受体(EGFR)发生了聚簇效应^[6,10]. 这和配体 EGF 激活 EGFR 受体而启动细胞爬行机制产生的效果类似, 即 PFMF 产生生物效应的机制与 EGFR 信号通路相关, 这在某种程度上说明了 PFMF 可能引发疾病的机理. 由于应力纤维是细胞中 F-actin 总量的主要成分, 该结果引出的新问题是, 除了 EGFR 通路激活导致 G-actin 向细胞边缘输送导致细胞中间的 actin 供应下降, 会使应力纤维总量减少外, 还有其他因素也能导致细胞应力纤维的 actin 聚合效率下降, 并由此导致全细胞的 F-actin 总量减少. 我们设想, 聚合过程中磁场可能会引起处于预结合态的 G-actin 位置发生偏转或偏移, 从而导致它结合到 F-actin 始端上的几率下降, 并导致 G-actin 聚合成应力纤维的效率下降. 在假定 F-actin 的解聚速率不变的情况下, G-actin/ F-actin 的平衡向解聚的方向移

动, 使总 F-actin 含量下降, 而 G-actin 浓度(尤其在细胞中央区域)上升; 同时由于爬行机制被磁场辐照开启^[9], 促使细胞在边缘生成爬行结构, 消耗大量的 actin 单体, 使得细胞边缘 G-actin 含量下降, 因此形成浓度差, 使细胞中央被解聚下来的 G-actin 更容易被调动到细胞边缘.

G-actin 蛋白的晶体结构分析提示, G-actin 由大致处于一个平面上的两大结构域构成, 每个结构域由各自 2 个亚结构域构成, 两大结构域之间有一个中间裂缝, 是 ATP 或 ADP 以及其他金属离子的结合位点^[11]. 在 pH 7 的溶液中, G-actin 带电量的测量值为 $-9.5e$ ^[12], 且电量在 4 个亚结构域的分布不均匀, 可视 G-actin 为一个带电荷的极性分子. G-actin 和 F-actin 都是带电结构, 电磁场中的感应电场(electric field, EF)和洛仑兹力(F_L)均可能对其产生作用, 可能使其聚合过程中应达成的方向或位置发生偏转或偏移, 使 G-actin 定位到 F-actin 的过程受到干扰, 从而使 G-actin 到达预结合状态的平均时间延迟; 而已到位但还没有形成结合态的 G-actin 也可能受到 EF 和 F_L 的影响而发生偏转, 无法按正常速率聚合到 F-actin 尾端上. 已知细胞中 G-actin 组装为 F-actin 的速率约为 73~146 个/s^[13], 即组装频率 f_a 的范围为 73~146 个/s, 取其中间值约为 109.5 个/s, actin 的平均聚集频率因此处在 ELF-MF 磁场方向变换频率范围内(0~600 Hz), 所以弱 ELF-MF 对微丝组装效率的影响可能存在辐照磁场频率相关性, 即在某些频段的磁场对微丝组装的干扰存在最大化效应, 而某些频段的磁场对微丝组装没有影响或影响微弱. 50 Hz 或 60 Hz 的 PFMF 方向变换的频率 f_m 为 100 次/s 或 120 次/s, 与 F-actin 的 f_a 的中值接近. 据此, 以 50 Hz 工频磁场为研究对象, 我们分别探讨了强度为 0.4 mT、以 50 Hz 为中心频段的 5 个频率(35、50、70、110 和 140 Hz, 对应的磁场方向变化频率 f_m 分别为 75、100、140、220 和 280 次/s)的 ELF-MF 对 FL 细胞微丝骨架的 F-actin 含量 / 微丝组装效率的影响, 以此考察在该频率范围内是否存在一个磁场干扰微丝组装的频率窗口, 并在此基础上, 利用荧光分子能量共振转移(FRET)技术验证该窗口频率对离体 G-actin 聚集成 F-actin 效率的影响程度. 然后进一步分析了带电的 G-actin 在外加交变电磁场中的受力情况, 初步分析了 PFMF 对 G-actin 聚集和分布的影响, 并尝试探讨其影响机制.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

Pyrene muscle actin(Cat.#AP05)购自 Cytoskeleton Co., Anti-actin antibody (Cat.#MAB1501) 购自 MILLIPORE Co., Anti-mouse IgG Fab2 Alexa Fluor® 488 Molecular Probes(Cat.#4408S)、Anti-mouse IgG Fab2 Alexa Fluor® 555 Molecular Probes (Cat.#4409S)购自 Cell Signaling Technology Co., 鬼笔环肽(phalloidin-TRITC, Cat. # P1951)、TritonX-100 (Cat.#T-8787)和 4% 多聚甲醛(paraformaldehyde, Cat.#C0403)购自 Sigma Chemical Co.. PBS 缓冲液(phosphate buffered saline)、胰酶(trypsin)和 MEM (minimum essential medium)购自上海钰森生物技术有限公司. 胎牛血清(fetal calf serum, Cat. #27250018)购自 Gibco 公司, 抗荧光猝灭封片液(PO126)购自碧云天生物技术研究所在. FL 细胞为浙江大学惠赠. G-buffer (2 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.2 mmol/L CaCl₂, 0.5 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L ATP)、F-buffer (5 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 2 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L ATP, 和 1 nmol/L phalloidin-TRITC)均为实验室配制.

1.2 实验设备

本研究使用的主要仪器为 Leica DM4000 LED 智能生物显微镜(免疫荧光形态学检测)、日立荧光分光光度计 F-2500(HITACHI, 蛋白质相互作用 FRET 稳态荧光测定)和磁场辐照系统. 其中磁场辐照系统如参考文献[14]中所示, 具体见图 1. 系统由辐射源、信号发生器、功率放大器和恒温装置四部分构成, 其中辐射源是一对直径为 40 cm、高为 20 cm, 150 匝铜线组成的 Helmholtz 线圈. 辐射源置于恒温装置细胞培养箱(PXY-DHS- II 型, 上海跃

进医疗器械)中, 与在培养箱外部的可调控的信号发射装置及功率放大器连接. 经高斯计测定, 该 Helmholtz 线圈中央区域存在一个直径为 10 cm、高为 10 cm 的匀场区, 且其强度可在 0~1 mT 区间可调^[12].

1.3 实验方法

1.3.1 FL 细胞培养、频率选择和免疫荧光实验

FL 细胞培养于细胞培养箱中(37°C, 5% CO₂), 培养基为 MEM 培养基(其中含 15% 胎牛血清, 100U/ml penicillin, 100 mg/L streptomycin). 取 5~7 代的 FL 细胞, 以 1×10^4 个/ml 的密度接种在铺有盖玻片的直径为 35 mm 的培养皿中, 分为 0(Sham)、35、50、70、110 和 140 Hz 磁场辐照 6 个组, 每组 3 个平行样. 辐照前, 细胞用无血清 MEM 培养基饥饿处理 12 h, 使其生长同步. 将细胞放置在 CO₂ 浓度为 5% 37°C 培养箱中的 Helmholtz 线圈中心均匀场区, 分别用 0(Sham)、35、50、70、110 和 140 Hz 的 0.4 mT 磁场辐照 30 min, 其中 Sham 组是在切断信号发生器和功率放大器的电源后, 放置在同样条件下培养. 辐照结束后, 采用参考文献[12]中免疫荧光技术方法将细胞经过固定、透化、并使用 10 mg/L 鬼笔环肽标记微丝、封片等步骤后, 用 Leica 智能生物显微镜拍照, 最后用 ImageJ 软件分析微丝的灰度值^[11]确定微丝含量. 其中选择 35 Hz 和 70 Hz 是因为其 f_m 接近微丝自组装频率 f_a 的 2 个极端频率 73 和 146 个/s; 选择 110 Hz 是因为其位于 50 和 60 Hz 工频磁场的频率 2 倍数值的平均值位置; 选择 140 Hz 是其 f_m 远远大于 f_a 的范围且不是 f_m 的倍数; 如果假设 f_a 呈正态分布, 频率窗口可能位于正态分布曲线的中间位置, 因此也选择 50 Hz 频率, 而 110 Hz 因它是 50 Hz 的 2 倍左右, 预期会有与 50 Hz 类似效果. 本实验重复 3 次, 其中 Sham 重复 6 次.

1.3.2 FRET 法检测 G-actin 离体自组装实验

参考张军等的方法^[15], 制备 G-buffer(溶解液)和 F-buffer(聚合液). 将肌动蛋白溶解于 G-buffer, 蛋白质终浓度为 1 g/L. 加入一抗, 4°C 孵育过夜后, 将该混合液分为 4 组, 在避光条件下分别加入带有荧光标记的二抗: a. Acceptor 组, 只加入带有 Alexa Fluor-555 标记的二抗; b. Donor 组, 只加入 Alexa Fluor-488 标记的二抗; c. FRET 组, 既加入 Alexa Fluor-555 标记的二抗也加入 Alexa Fluor-488 标记的二抗、且浓度比为 2:1; d. 背景组, 不添加带荧光标记的二抗. 全部避光孵育

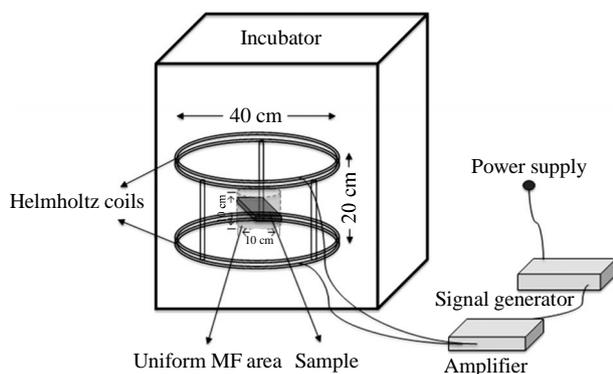


Fig. 1 Exposure system of ELF-MF

30 min 后, 除了背景组外, 将孵育好的其他各组样品再分别分为 Sham 组、35 Hz、50 Hz 和 70 Hz MF 辐照组. 最后在各组中加入 F-buffer, 使 G-actin 终浓度为 10 mg/L, 一抗最终稀释比为 1/400, 带有 Alexa Fluor-555 与 Alexa Fluor-488 标记的二抗最终稀释比分别为 1/300 与 1/600. 受体荧光分子浓度是供体的 2 倍, 以保证 80% 的供体分子至少有一个配对的受体染料分子^[6]. 样品的 pH 为 7.5.

将辐照组样品置于同 1.3.1 所述的 0.4 mT、频率分别为 35、50、70 Hz 的辐照系统中避光辐照 30 min; Sham 组和背景组样品置于关闭信号发生器和功率放大器电源后的辐照系统中假辐照 30 min. 再分别将各组样品缓慢地移入容积为 200 μ l 的石英比色皿中, 用日立荧光分光光度计 F-2500 进行稳态荧光测定. 设定发射光测量范围为 500~600 nm, 扫描电压为 400 V, 入射光与出射光狭缝宽度设置为 10 nm. Donor 组 Alexa-488 的激发光波峰为 495 nm, 发射光波峰为 519 nm, Acceptor 组 Alexa-555 的激发光波峰为 555 nm, 发射光波峰为 565 nm. 用 Donor 的激发光波长激发 FRET 组. 若没有 FRET 现象发生, 则在 500~600 nm 的光谱范围只能检测到明显的波峰为 519 nm 的发射谱, 以及微弱的波峰为 565 nm 的发射谱. 当有 FRET 现象发生时, 由于蛋白质分子间相互作用加强, 作用分子间的平均距离达到或小于 10 nm, 促发荧光能量从供体转移到受体, 即发生能量共振转移. 此时会发生荧光强度 (fluorescence intensity, FI) 在供体发射光 519 nm 峰值处下降, 同时在受体发射光 565 nm 峰值处上升的现象. 此时分别检测各 FRET 组中在 519 nm 处荧光强度相对供体组下降的百分比或在 565 nm 处荧光强度相对于受体组上升的百分比, 即可判定各组 FRET 的效率. 本文利用 Origin 软件制作所采集的荧光数据曲线图, 并用 Sigma 软件分析各组 FRET 效率的变化和统计误差. 此实验重复 12 次, 其中 35 Hz 组和 70 Hz 组重复 3 次.

1.3.3 G-actin 受磁场作用的理论计算和统计方法

a. G-actin 在溶液中净带电量分析和估算

为相对准确地分析 G-actin 在某 pH 溶液中带有的净电荷, 根据构成肌动蛋白单体的氨基酸序列, 并运用“*He-Ha*”氏方程, 首先得出氨基酸在解离状态下主要存在的离子形式. “*He-Ha*”氏方程为

$$\text{pH} = \text{pk}' + \lg \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (1)$$

式中, k' 为滴定该基团的表现解离常数, 常用滴定法测得. 通过 $\text{pk}' = \text{pk} + \Delta\text{pk}$ 校正在溶液中电离的总离子强度对 pH 的影响, Δpk 可通过查表^[7]获得.

本文讨论的溶液 pH 值约为 7.5. pH=7.5 时, 一些 R 基将解离并带有一定的电荷, 例如: Asp 的 β -COOH (等电点 $\text{pI} = 2.97, -1e$), Glu 的 α -COOH ($\text{pI} = 3.22, -1e$), Lys 的 ϵ -NH₂ ($\text{pI} = 9.74, 1e$), Arg 的 δ -胍基 ($\text{pI} = 10.76, 1e$), His 的 β -咪唑基 ($\text{pI} = 7.59, 1e$) 等. 其中在 pH 7.5 时, Asp、Glu 残基的羧基基团将处于解离状态而各带有 1 个单位的负电荷, Lys、Arg、His 的残基各带 1 个单位的正电荷, Ala、Gly、Leu、Thr、Tyr、Met、Ile、Ser、Phe、Val、Cys、Gln、Pro、Asn、Trp 的残基基团解离度低, 对蛋白质的带电量几乎没有影响. 此外, 在与 G-actin 结合的金属离子中, 只有 3 个分别位于亚结构 I、II、IV 表面的钙离子会解离^[8]. 据此, 在不考虑生理条件下某些氨基酸残基可能由于被包埋而不发生解离的情况下, 可得到 G-actin 蛋白上各结构域的电荷分布情况和净电荷量.

b. G-actin 在 PFMF 中的受力分析计算

G-actin 在细胞中的组装状态始终处于动态过程. 根据电磁学理论, 在交变磁场中, 运动的带电粒子同时受多种力的作用, 包括感生电场力和洛伦兹力等. 由于细胞垂直于磁感线呈水平放置, 重力对 G-actin 组装的影响可以忽略, 我们主要考察洛伦兹力和感生电场力的大小.

在 37°C 的培养环境中, 细胞内处于游离状态的 G-actin 热运动非常剧烈, 初速度 v 可达到 m/s 的数量级^[9]. 因此推想当运动方位恰好正确的 G-actin 向 F-actin 生长端运动并准备结合时, 由较大的热运动初速度而产生的较大干扰性的洛伦兹力会影响微丝的正常组装. 查文献可知 G-actin 带电量 q 为 $-9.5e$ ^[7], 其中 $e = 1.602 \times 10^{-19}$ 库伦, 采用的 PFMF 频率 $f = 50$ Hz, 磁感应强度公式为:

$$B_{\omega} = B_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (2)$$

$$\text{最大值 } B_0 = 0.4 \cdot \sqrt{2} \text{ mT}, \quad \omega = 2\pi f$$

由此可求出洛伦兹力 F_L 为:

$$F_L = qv \times B \quad (3)$$

洛伦兹力方向始终垂直于 B 和 v .

根据电磁感应原理, 方向平行于中轴线且随时间变化的圆柱形均匀磁场 B 会感应产生以中轴线为圆心且垂直于中轴线的环形感生电场 E , 且与该

空间的电导率无关. 在该空间中任意一点(距中轴线的垂直距离为半径 R)的感生电场强度为:

$$E = \frac{\partial B}{\partial t} \times \frac{R}{2} \quad (4)$$

其中 $\partial B/\partial t$ 为磁场变化率, R 为圆周半径矢量^[20]. 由公式(2)可得

$$E = \frac{\omega R B_0 \cos(\omega t)}{2} \quad (5)$$

如果将细胞内中心区域靠近 F-actin 结合端的某个 G-actin 简化为一个质量为 m , 带负电荷 q 的质点, 则其在感生电场中半径为 R 的位置受到的电场力为:

$$F_e = q \cdot E = \frac{\omega q R B_0 \cos(\omega t)}{2} \quad (6)$$

其中电场力的方向为环形电场线的切线方向.

由以上洛伦兹力 F_L (3)和感生电场力 F_e 公式(6), 初步计算得到 F_L 和 F_e 的最大值都在 10^{-21}N 的数量级范围, 进而可从理论上推导这两个力的作用效果, 得到工频磁场影响微丝组装的机理.

c. 统计学处理

FRET 实验中, FRET 效率的计算公式为 $\text{FRET}\% = [(F_{I_{519d}} - F_{I_{519f}})/F_{I_{519d}}] \times 100\%$ (或者 $\text{FRET}\% = [(F_{I_{565t}} - F_{I_{565a}})/F_{I_{565a}}] \times 100\%$). 本文使用 origin 软件对 FI 数据进行重绘图, 使用 Sigma Plot 软件对数据进行线性和非线性回归处理及作统计分析图, 采用 Image J 软件对免疫荧光照片进行灰度值采集. 所有数据均用平均值 \pm 标准方差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示, 用 t 检验(student-test)得到的 P 值衡量差异是否有显著性, 认为 $P < 0.05$ 时即有显著性差异, n 表示试验重复次数或者有效通道数.

2 实验结果

2.1 0.4 mT 磁场对 FL 细胞微丝装配的影响程度与磁场频率相关

前期工作^[9]表明, 在 EGF 缺失的情况下, 0.4 mT PFMF 辐照 FL 细胞激活了 EGFR 信号通路, 诱使细胞微丝骨架重组, 使细胞中央应力纤维减少, 并导致平均每个细胞微丝总量下降, 因此, 通过观察等强度但频率不同的磁场对 FL 细胞中微丝分布和含量的影响程度, 可以衡量磁场使细胞产生电磁生物学效应的程度与磁场频率的相关性. 不同频率的磁场对 FL 细胞中 F-actin 的分布及总量的影响如图 2a 所示, 相对 Sham 组细胞, 35、70 和 140 Hz 组的细胞中 F-actin 分布没有明显变化, 而 50 Hz 组的细胞中心部位 F-actin 含量明显变少, 平

行束状的应力纤维基本消失. 110 Hz 磁场也有类似的影响, 但效果不如 50 Hz 磁场显著. 灰度值分析的统计结果如图 2b, 从图中可以看出, 相对于 Sham 组, 35、70 和 140 Hz 的磁场辐照后, 平均每个细胞的总 F-actin 灰度值没有明显变化, 而 50 Hz 与 110 Hz 导致平均每个细胞的总 F-actin 灰度值分别下降了 $(34.66 \pm 3.14)\%$ 和 $(28.26 \pm 0.70)\%$ (箭头所指), 具有显著性差异. 为更清晰地表征各频率干扰微丝组装效果的相对强弱关系, 根据图 2b 各组的灰度值拟合出图 2c, 由图可知在所选择的 5 个频率中, 50 Hz 的磁场诱导微丝重组、降低 F-actin 总量的效应最为明显, 而 110 Hz 的磁场次之. 即在场强相同的情况下, 相对于其他频率, 50 Hz 的磁场对细胞微丝骨架稳定性的干扰可能最强, 而约其 2 倍频率的 110 Hz 磁场对细胞骨架组装的影响也较为显著, 说明磁场产生生物效应的程度可能与磁场频率相关, 且可能会存在一个在 50 Hz 左右的频率窗口. 尚不清楚 60 Hz 的工频磁场是否也存在此效应, 需待后期实验检测.

2.2 0.4 mT、50 Hz 磁场对 G-actin 离体自组装成 F-actin 具有明显的干扰效应

前期研究结果显示, 0.4 mT、50 Hz 磁场对细胞骨架组装和爬行机制具有显著影响, 对 G-actin 组装成 F-actin 具有显著的抑制作用. 且本研究的上述结果(图 2)显示, 相对于其他 4 个频率, 50 Hz 的磁场对微丝骨架装配的干扰效应最强, 表明磁场对微丝骨架的干扰效果可能与磁场的频率相关, 而 50 Hz 可能是其中的一个频率窗口, 引发的干扰效应最强. 但是磁场对 F-actin 骨架装配的干扰机制还不清楚, 特别是分子水平的图像还不清晰. 由于 F-actin 是由多个 G-actin 单体聚集而成的纤维, 其组装效率和 G-actin 单体间相互作用的强弱有关. 在 FL 细胞中的最强干扰效应出现在 50 Hz, 据此我们推测对离体 G-actin 自组装成 F-actin 过程产生最显著影响的磁场频率也应在 50 Hz. 为此, 本研究采用 FRET 方法, 考察比较了在 Sham 条件下和分别受 35、50、70 Hz 磁场辐照时, 离体的 G-actin 蛋白自组装成 F-actin 过程的蛋白质相互作用强度和区别, 从而考察磁场干扰 actin 微丝组装的分子基础, 进一步验证 50 Hz 是否由于与微丝自组装频率的特殊相关性而对 actin 组装效率具有效果显著的干扰. FRET 实验所用激发光波长均为供体 (donor) 激发光谱波峰值 (495 nm), 实验采集了各个样品在 500~600 nm 波长范围内的发射光强度 (FI)

并进行比较分析. 实验结果如图 3 所示, Donor、Acceptor 和 FRET 3 条曲线代表这 3 种标记(具体见实验方法)条件下的 FI 值, a+d 是 Acceptor 与 Donor 曲线的数字叠加结果. 从图 3 中可以清晰地看出, 各组中的 FRET 曲线相比其 Donor 或者 Acceptor 曲线, Sham 组、35 Hz 组和 70 Hz 组在 519 nm 左右的 FI 明显下降, 平均下降幅度分别为 $(17.69 \pm 5.25)\%$ 、 $(32.50 \pm 2.77)\%$ 和 $(17.12 \pm 5.22)\%$, 在 565 nm 左右的 FI 明显上升, 平均上升幅度分别为 $(176.92 \pm 15.99)\%$ 、 $(164.24 \pm 29.82)\%$ 和 $(148.91 \pm 19.87)\%$, 即在这两组条件下, 存在明显的 FRET

现象, 说明 G-actin 单体间的平均相互距离减小, 能量转移效果明显, 提示此时的蛋白颗粒具有有效组装成为 F-actin 的潜力. 相对而言, 50 Hz MF 组的 FRET 效应最弱, 在 519 nm 处的 FI 下降幅度仅为 $(1.18 \pm 1.52)\%$, 而在 565 nm 处的 FI 上升幅度仅为 $(130.41 \pm 17.74)\%$. 说明相对 Sham 组和 f_m 位于微丝自组装频率范围边缘的其他两个频率, 在 50 Hz MF 辐照情况下, G-actin 单体间平均相互接近的程度更小、平均距离更大, 这意味着它们组装成 F-actin 的效率下降. 这个结果解释了我们前期的实验结果^[1,4].

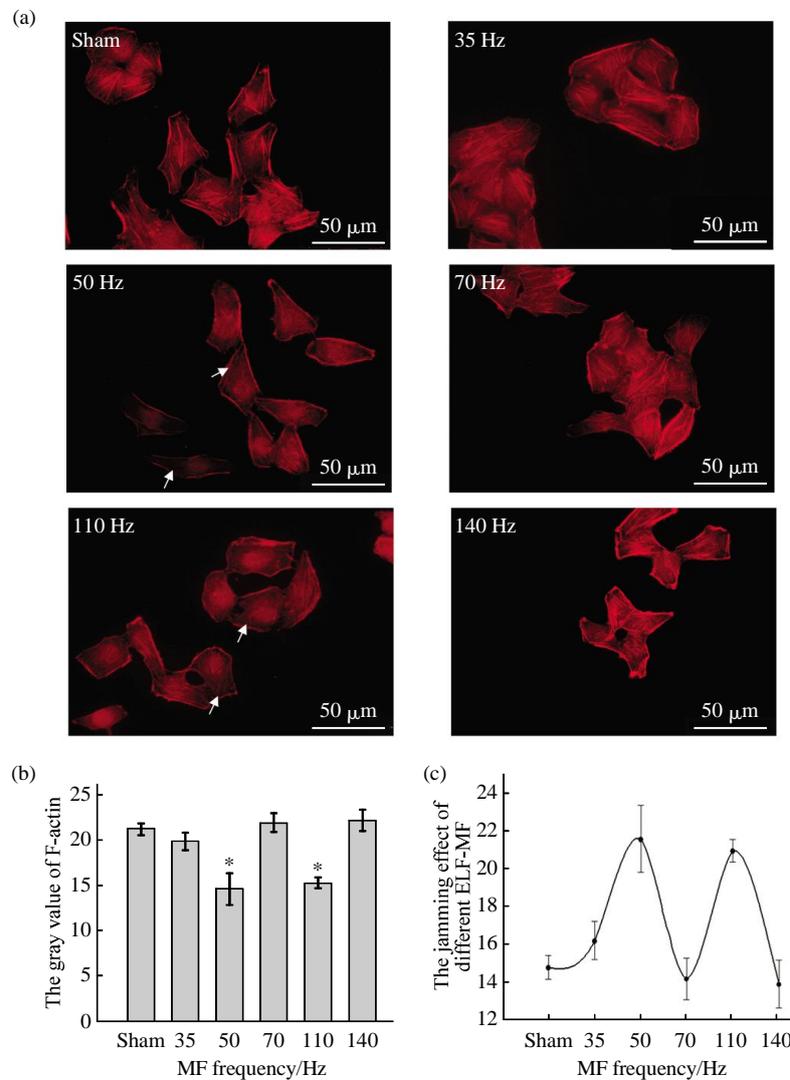


Fig. 2 The frequency effect of 0.4 mT extremely-low frequency magnetic fields on F-actin assembly in FL cells

(a) The immunofluorescence picture of Sham, 35 Hz, 50 Hz, 70 Hz, 110 Hz, and 140 Hz MF-exposed. (b) The average gray value of F-actin in each cell. (c) The relative jamming effect of different ELF-MF. The data shown is the $\bar{x} \pm s$. Sham: $n=6$; The rest: $n=3$.

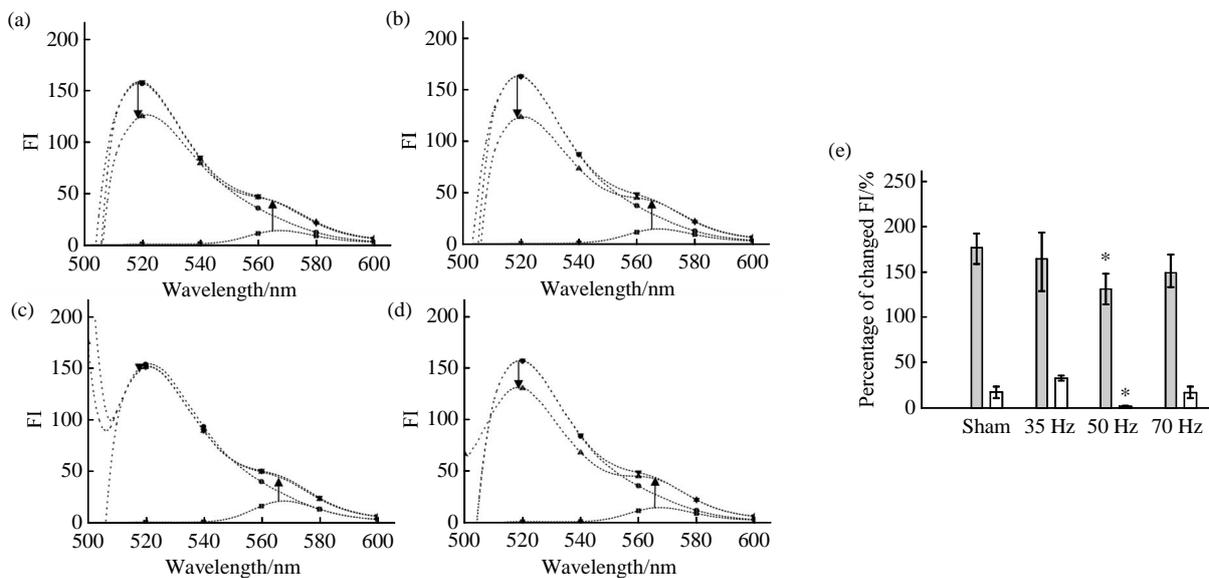


Fig. 3 Effects of ELF-MF on G-actin assembly *in vitro*

(a)~(d) FI of Sham (a), 35 Hz (b), 50 Hz (c), 70 Hz (d) MF exposed samples. Acceptor: FI of samples with only Alexa-555 labeled. Donor: FI of samples with only Alexa-488 labeled. FRET: FI of samples with both Alexa-555 and Alexa-488 labeled. a+d: FI of acceptor plus donor. ■---■: Acceptor; ●---●: Donor; ▲---▲: FRET; ▼---▼: a+d. (e) FI decreased percentage at donor emission peak (519 nm) and FI increased percentage at acceptor emission peak (565 nm), the data is shown as the $\bar{x} \pm s$. Sham, 50 Hz: $n=12$; 35 Hz, 70 Hz: $n=3$. □: Acceptor; □: Donor.

2.3 G-actin 电荷分布模型及在 PFMF 中 G-actin 受力和运动情况分析

2.3.1 G-actin 电荷分布模型

参照文献[21]中的 G-actin 三维分子模型及本研究计算所得其各氨基酸残基在 pH 7.5 时的带电情况, 可以得到 G-actin 电荷分布模型(图 4a), 图中标注了 G-actin 各亚结构域及 ATP 带的电荷及其

位置. 将 G-actin 蛋白各亚结构域的电荷叠加整理简化后如图 4b 所示, 然后按照电荷分布粗略地划分成 2 个极电荷区, 得到如图 4c 所示的简化球状模型, 亚结构域 I、III、IV 整体所在一端可看作负极, 亚结构域 II 所在一端为正极. 缺口部位表示蛋白质结合端的正端.

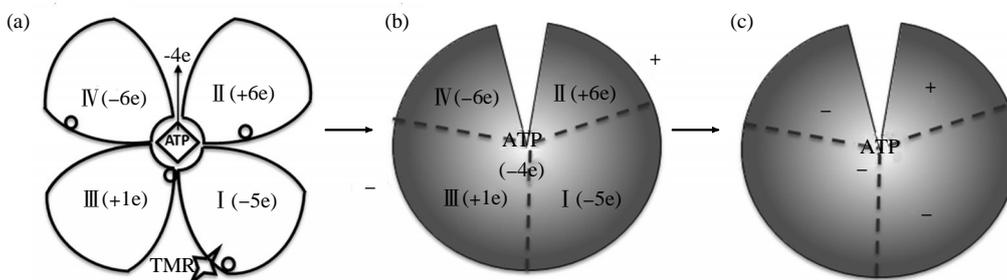


Fig. 4 The charge distribution model of a G-actin

(a) The simulated conformational diagram of G-actin . The quantities of electric charge on different subdomain of G-actin have been marked , and the 4 little circles represent 4 Ca²⁺ ions binding to the G-actin. (b) A simplified model of G-actin. It can be seen as a asymmetric sphere which contains a breach on it. The total charges of each sub domain have been marked. (c) The simplified model of G-actin of charge polarization.

2.3.2 PFMF 中自由 G-actin 的受力分析

PFMF 呈周期性变化, 根据法拉第电磁感应定

律, 在其所在空间里会有周期性变化的感生电场 (EF)产生, 如图 5a, EF 场与 PFMF 场之间存在 90°

相位差, 图中的 EF 场强峰值不代表其实际大小. 此感生电场为涡旋电场(vortex electric field), 电场线所在平面与细胞培养皿平行, 垂直于磁感线. 假

设某时刻磁场方向刚变成垂直于纸面向里, 对应产生的涡旋电场方向如图 5b 所示.

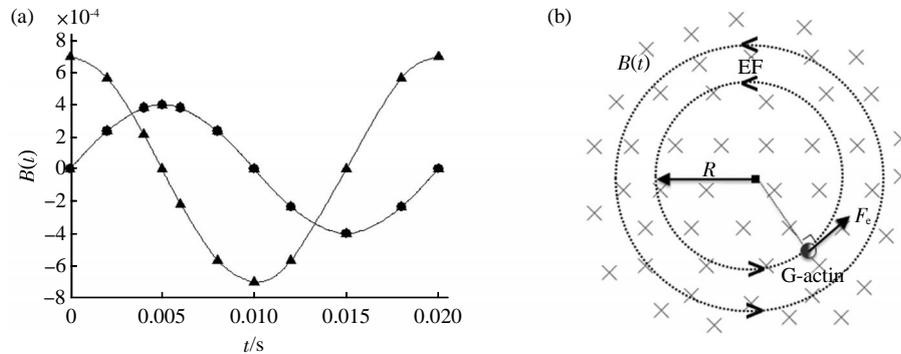


Fig. 5 Variation and distribution of the vortex electric field

(a) Intensity of PFMF and EF vs. time. ●—●: PFMF, ▲—▲: EF. (b) Distribution map of the vortex EF line. The crosses are PFMF line vertically going inside the paper plane, its intensity is $B(t)=B_0 \times \sin(\omega t)$ as shown in (a); the annular dotted lines are the vortex electric field(EF) that is vertical to the MF direction. R is the radius of EF. F_e is the induced electric field force.

细胞内游离的 G-actin 受到随时间周期性变化的洛伦兹力 F_L 和感生电场力 F_e 作用, 这两个力都在垂直于磁感线的 xy 平面内. 由公式(3)(6)得出细胞中单个 G-actin 在 PFMF 中受到的 F_L 和 F_e 的最大值都在 10^{-21}N 的数量级范围, 因此推断 F-actin 装配效率的改变是这两个力共同干扰的结果. 如果仅仅考虑处于预结合范围的微小区域内的 G-actin 蛋白, 在 F-actin 组装的动力学过程中, 这些 G-actin 要达到预结合状态, 正确的运动方位尤其重要, 虽然 PFMF 场中这两个力不算大, 但其对 G-actin 运动方向上产生的定向影响不可忽视. 其中 F_e 沿着环形电场线的切线方向有正反两个方向的周期性震荡, 由此产生的干扰 F-actin 组装的概率远大于促进组装的概率. 而 F_L 本身不改变速度的大小只改变速度的方向, 每当 G-actin 有正确的结合速度时, 它总可能在与此速度垂直的方向产生震荡性干扰作用, 使在这个范围内预结合的 G-actin 能正确结合到 F-actin 正端的效率降低.

2.3.3 PFMF 中 G-actin 装配成微丝过程的受力分析

实际上, G-actin 即便在游离状态时也不是完全自由的, 它会受到细胞内微环境的影响, 尤其在准备结合到 F-actin 上时受微丝自身带电环境的影响. 由于 F-actin 链上每个 G-actin 都带有电荷, 因此 F-actin 周围也被自身产生的电场 E_a 包围. 我们将微丝视为一条均匀带电荷的直细线, 假设一条微

丝是由 N 个 G-actin 组成的直线结构, 在 F-actin 与 G-actin 结合端, G-actin 受到沿微丝方向的聚合力 F_a (图 6)吸引. 已有相关研究证明, 微丝组装依靠的分子间作用力主要是静电力和范德华力, 在与 ATP 和 Ca^{2+} 结合的状态下, G-actin 的哈梅克常数 A_H 为 $(10.4 \pm 0.6) kBT$, 这个相对高的哈梅克常数说明 G-actin 有趋于聚合的趋势^[22]. 若我们只考虑预结合状态时这一微环境下 G-actin 在 PFMF 中的受力情况(其他状态的 G-actin 对组装效率影响较小), 则在细胞内任一点处的微丝正端附近, 处于这个状态的 G-actin 主要会受 3 个力作用(F_L 、 F_e 和 F_a), 合力可写为:

$$F = F_e + F_a + F_L \quad (7)$$

其中, F_a 为 F-actin 纤维链产生的聚合力, F_e 为感生电场作用于 G-actin 上的电场力, F_L 为洛伦兹力.

如图 6 所示, 这 3 个力都处于垂直于磁感线 B 的 xy 平面内. 假设某一刻磁场方向刚刚变为垂直于纸面向里的方向, 在第 1/4 T 内, G-actin 受到的感生电场力为 F_e , 受到的洛伦兹力为 F_L , 这 2 个力产生的干扰合力为 F_h . 随着 $B(t)$ 的变化, F_e 和 F_L 的大小、方向也发生周期性改变, F_e 和 F_L 存在 90° 的相位差, 在第 2/4 T、第 3/4 T 和第 4/4 T 内, 由 F_e 和 F_L 产生的干扰合力分别为 F_h' 、 F_h'' 、 F_h''' . 由公式(3)和(6), 可得干扰合力 F_h 是一个有关 $A \sin$

$(\omega t + \Phi)$ 函数, 除了 F_h 为零时和与 F_a 方向相同时, 其他情况下 F_h 都与 F_a 存在一个不为零的 Θ 角, 即 PFMF 以此方式干扰 F-actin 的聚合, 如图 6 所示. 图中表示力的箭头的长短与实际力的大小没有直接关系, 只表示大致的受力情况. 值得注意的是, 由于感生电场力的大小与它和磁场辐照中心的距离成正比, 因此, 放置于磁场中心的细胞会受到更小的电场力的干扰, 此时主要的干扰因子是洛伦兹力.

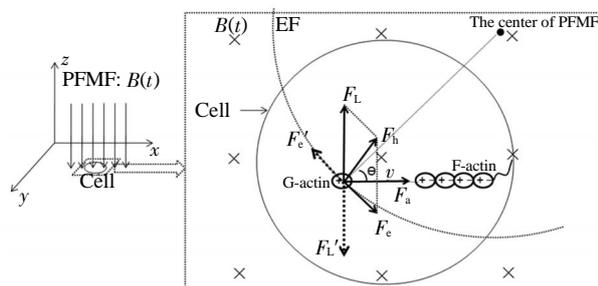


Fig. 6 Stress analysis of G-actin when it is assembling to F-actin

On the left it shows a cell in the 3D cartesian coordinate system, which is a simplified representation of the cells in PFMF system, and the right part which is surrounded by dotted box is the partial enlarged drawing of cell. F_a : the aggregation force between G-actin and F-actin; F_L : the Lorentz magnetic force (Along the $-y$ axis direction); F_L' : the Lorentz magnetic force (Along the $+y$ axis direction); F_e : the force of the electric field (counter-clockwise sense); F_e' : the force of the electric field (clockwise sense); v : The velocity of G-actin when it is preparing to assemble with F-actin; F_h : during 1/4 cycle, the resultant force of F_L and F_e .

对于极低频磁场干扰微丝组装的频率选择性, 推测可能与共振频率相关, 即微丝组装频率 f_a 与磁场方向变化频率 f_m 的一致性. 在这个条件下的 PFMF 中, 若 actin 单体刚到达预结合态, 此时磁场方向恰巧改变, 就会使 G-actin 单体的运动方向发生偏移, 脱离预结合态, 导致原本将结合到 F-actin 上的 G-actin 继续保持游离状态, 而当该 G-actin 或其他 G-actin 重新形成预结合态时, 可能已经耗费 0.01 s (即半个磁场变化周期), 磁场方向又一次改变, 使得预结合态又一次被打破, G-actin 还是不能聚集到 F-actin 上. 如此反复, PFMF 中 F-actin 的组装速率就会显著下降. 同样, 若 f_a 与 f_m 呈倍数关系, 也会产生类似干扰, 但干扰程度较小.

除了会影响 G-actin 正确组装到 F-actin 上的预结合态, PFMF 引起 F-actin 系统重组的另一个可能机制是: 在涡旋电场力的作用下, 因受干扰无法结合到微丝上的自由 G-actin 蛋白可能会沿着电场线的切线方向运动, 其中一部分会离开细胞中心区, 使这区域的 G-actin 蛋白浓度呈下降趋势, 而细胞边缘的 G-actin 蛋白浓度呈上升趋势, 从而促使细胞中心应力纤维解聚趋势大于聚合趋势, 而细胞边缘则相反, 导致边缘更易形成伪足和黏连斑结构.

3 讨 论

前期有研究报道, 一定强度和时间的 PFMF 暴露对细胞的增殖分化、特定基因的修饰与合成^[23]、组织的氧化应激效应和炎症反应^[24]等不同层次的生理过程都有不可忽视的显著影响. 其中环境 PFMF 暴露诱导细胞骨架重组的生物效应也是研究者非常感兴趣的领域. 鉴于细胞骨架结构紊乱是细胞癌化的一个显著特征, 目前对于 PFMF 暴露引起微丝、黏连斑等骨架结构重组^[25]以及促进细胞增殖爬行^[26]等的研究可能是验证其是否是可疑致癌源的一个突破口之一. 我们的前期研究发现 PFMF 辐照有促进 FL 细胞中央应力纤维解聚并在细胞边缘诱导生成伪足等效应, 但是我们不清楚是否仅 PFMF 才能产生该生物效应, 还是其他频率的 ELF-MF 也具有类似的特性. 从物理学角度看, 在微观层面上物质粒子的能量状态、粒子之间或粒子与场之间的相互作用机制都与外场频率高度相关. 外场频率的不同直接影响粒子的受激振荡频率, 进而会使粒子间相互作用效果发生改变. 在一定的频率下可能相互作用不明显, 但在其他的一定频率下则可能有大幅度的增强, 例如产生共振现象. 我们采用的磁场是交变磁场, 本身具有鲜明的频率变化特点, 其诱导的电场也呈现周期变化规律, 而且我们考察的 G-actin 聚集成微丝的过程也有其固定的节奏, 这些特性促使我们开始研究外磁场频率对细胞骨架稳定性产生干扰是否存在频率敏感度.

我们设想, 弱 ELF-MF 作用于细胞 actin 骨架的生物效应大小可能存在一定的频率相关性, 为此, 试图从实验实证和理论分析两个角度, 在细胞和分子水平上对 MF 的频率与细胞骨架的微丝结构变化程度之间的关系进行初步探讨. 研究结果证明, FL 细胞在经 0.4 mT 磁场辐照 30 min 后, 相较于 Sham 组, 5 组辐照组 (35、50、70、110 和 140 Hz 组) 中, 50 Hz 组细胞的微丝中空化明显, 意

意味着中心区微丝骨架趋于解聚, 110 Hz次之, 说明磁场对于 FL 细胞微丝骨架装配效率的影响在频率为 50 Hz和其叠加频率附近可能具有窗口效应. 由于感生电场的方向改变频率 f_e 等同于磁场方向变化的 f_m , 是其磁场频率的 2 倍, 我们推测磁场频率为 F-actin 自组装频率的 1/2, 即 36.5~73 Hz时, 对 F-actin 组装的影响达到最大, 而 50 Hz很接近这个范围的中值, 因此可能产生最显著的影响. 而 35 Hz 和 70 Hz则在上述范围的外围边界, 故对 F-actin 组装的影响程度不如 50 Hz大. 140 Hz则远超出了这个范围, 故其影响可以忽略不计. FRET 的结果也和此相互映证, 在分子水平上 0.4 mT、50 Hz的工频磁场对离体 G-actin 自组装过程的干扰程度的确远较其他 3 个条件(Sham、35 Hz、70 Hz)也更为强烈, 即经 50 Hz磁场辐照后的离体 G-actin 自组装为 F-actin 的效率降低, 验证了 50 Hz附近可能具有一个磁场对微丝装配效率产生明显生物效应的频率窗口. 实验中, 我们观察到 110 Hz磁场辐照下细胞骨架密度也呈现较弱的下降趋势, 提示可能存在减弱趋势的频率叠加效应. 但目前我们还不清楚北美通用的 60 Hz的工频磁场是否也有类似效应, 以及其他临近频率的影响等, 这些工作都有必要进一步开展.

参照前人的工作和运用“He-Ha”氏方程分析得到 G-actin 可看做一个整体带负电荷的点电荷, 电荷量理论值为 $-8e$, 实际测量为 $-9.5e$. 根据比较蛋白在 PFMF 中所受感生电场力 F_e 和洛伦兹力 F_L 的大小, 可知 F_e 与 F_L 最大值同在一个数量级, 故推测 F-actin 装配效率的改变受这两个力共同干扰. 对微丝装配进行模拟的结果显示, 当 G-actin 向着 F-actin 的延长端运动时, 在这两个力的干扰作用下, 部分 G-actin 的速度会发生衰减从而使其到达结合端的时间延迟, 部分 G-actin 在到达与 F-actin 的结合范围时, 会恰好因此刻合力方向与之相异而发生偏转, 这样也不能正常结合至微丝上, 综合结果导致 F-actin 的装配速率下降, 细胞中心区的 G-actin 浓度相对升高. 又由于在 PFMF 场中 f_m 与 f_a 的频率相关性, 使得 F_L 和 F_e 的干扰效率明显更强, 因此表现出了微丝组装效率的频率选择性. 在此过程中, 随着电磁场的振荡, G-actin 所受力的大小和方向呈周期性改变, actin 蛋白被迫发生周期性的受激振荡, 并可能会发生来回的回旋趋势的运动, 在离心力的作用下向细胞边缘缓慢移动, 从而导致细胞中心缺乏足够的 G-actin 蛋白

来源, 而单细胞边缘源于大量新蛋白的供给能够提供形成新的伪足结构的原料, 从而导致 F-actin 在细胞层面的分布改变. 这也有效地说明了我们前期发现的弱 PFMF 导致 F-actin 簇在 FL 细胞的中心部位分布减少, 而边缘部位增加的现象. G-actin 的结合率下降程度, 应该与工频磁场强度有关, 但是否与细胞种类有关则还需要进一步实验研究. 此外, 由于 EGFR 信号通路启动的缘故, 细胞受刺激在边缘生成爬行结构消耗大量的 G-actin, 使 G-actin 在细胞边缘的浓度下降, 产生更大的自由 actin 需求, 从而与细胞中央形成浓度差, 也是一个促使细胞中央的 G-actin 扩散到细胞边缘的自身效应. 所以我们观察到的上述现象应该是综合各个不同的效应的最终结果.

除了对 FL 细胞微丝骨架组装影响的考察外, 有研究通过扫描电子显微镜观察 0.4 mT、50 Hz PFMF 辐照后的 CHL 细胞表面形态, 发现长时间辐照后(12 h 和 24 h)细胞表现出更加明显的伪足增多、细胞扁平、细胞融合现象^[7]. 此外, PFMF 还可促进内皮细胞的迁移和管腔的形成^[20]以及人克隆结肠腺癌细胞的增殖^[21]. 本研究的分析结果认为, 0.4 mT、50 Hz磁场辐照 30 min 引起 G-actin 组装成 F-actin 的速率下降, 也可能促使 G-actin 单体向细胞边缘移动, 这可能是上述报道中的这些生理变化出现的原因之一, 因此本研究对于解释电磁场产生的部分生物效应提供了可能的一种解答. 此外本研究还发现, 不同的电磁场辐照频率对 actin 的结合率的影响程度存在差异, 可能是由于辐照场的频率直接影响了 actin 蛋白受力方向和大小的变化周期, 这对揭示 ELF-MF 的电磁生物学机制及延迟效应的研究提供了新的有价值的实验依据. 事实上, G-actin 并不能简单地看做一个偶极子, 而且由于细胞质的离子浓度影响, 细胞中的真实电场和磁场很可能比我们拟合的由匀强磁场和涡旋电场组成的复合场更为复杂, 因此拟合计算的精确度和准确度还需要进一步提高. 即便如此, 我们的计算结果在一定程度上可以介绍工频磁场影响微丝骨架重组的原理, 并可以使之成为考量极低频磁场安全性的参量之一.

参 考 文 献

- [1] 吴 霞. 0.4mT 工频磁场辐照对 FL 细胞与细胞骨架和爬行相关的信号蛋白的影响初探[D]. 上海: 华东师范大学物理系, 2013
Wu X. Shanghai: Department of physics of East China Normal University, 2013

- [2] 方卫飞. 手机电磁辐射的生物效应及机理研究. 金华职业技术学院学报, 2004(2): 22-26
Fang W F. Journal of Jinhua Polytechnic, 2004(2): 22-26
- [3] 吴 璟. 高压输电线电磁环境模拟系统及其生物效应研究[D]. 成都: 电子科技大学, 2003
Wu J. Chengdu: University of Electronic Science and Technology, 2003
- [4] 褚克平. 50Hz 工频磁场对成纤维细胞微丝骨架装配的影响[D]. 上海: 华东师范大学物理系, 2007
Chu K P. Shanghai: Department of physics of East China Normal University, 2007
- [5] Vecchia P, Hietanen M, Matthes R, *et al.* Guidelines for limiting exposure to time-varying electric and magnetic fields(1 Hz-100 kHz). Health Physics, 2010, **99**(6):818-836
- [6] Jia C L, Zhou Z J, Liu R C, *et al.* EGF receptor clustering is induced by a 0.4 mT power frequency magnetic field and blocked by the EGF receptor Tyrosine Kinase Inhibitor PD153035. Bioelectromagnetics, 2007, **28**: 197-207
- [7] Blackman C F, Benane S G, House D E. The influence of 1.2 mT, 60 Hz magnetic fields on melatonin- and tamoxifen-induced inhibition of MCF-7 cell growth. Bioelectromagnetics, 2001, **22**: 122-128
- [8] 赵 晋. 工频磁场对中国仓鼠肺成纤维细胞 F-actin 细胞骨架及其相关信号分子的影响[D]. 浙江: 浙江大学医学院, 2010
Zhao J. Zhejiang: Medical College of Zhejiang University, 2010
- [9] Wu X, Cao M P, Shen Y Y, *et al.* Weak power frequency magnetic field acting similarly to EGF stimulation, induces acute activations of the EGFR sensitive actin cytoskeleton motility in human amniotic Cells[J/OL]. PLOS ONE, 2014, **9**: 1-17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3914819>
- [10] 孙文均, 付一提, 鲁德强, 等. 工频磁场诱导肺成纤维细胞膜受体聚簇及噪声磁场的干预作用. 中华预防医学杂志, 2004, **38**(1): 5-7
Sun W J, Fu Y T, Lu D Q, *et al.* Chinese Journal of Preventive Medicine, 2004, **38**(1): 5-7
- [11] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 280-290
Zhai Z H, Wang X Z, Ding M X. Cytobiology. III. Beijing: Higher Education Press, 2007: 280-290
- [12] Bartels E M, Cooke P H, Elliott G F, *et al.* The myosin molecule—charge response to nucleotide binding. Biochimica et Biophysica Acta, 1993, **1157**(1): 63-73
- [13] Theriot J A, Mitchison T J, Tilney L G, *et al.* The rate of actin-based motility in intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. Letters to Nature, 1992, **357** (21): 257-260
- [14] 褚克平, 蔡知音, 张丹英, 等. 0.2mT 引起人羊膜成纤维细胞微丝骨架重组. 中华预防医学杂志, 2007, **41**(5): 391-395
Chu K P, Cai Z Y, Zhang D Y, *et al.* Chinese Journal of Preventive Medicine, 2007, **41**(5): 391-395
- [15] 张 军, 王远亮, 何创龙, 等. 激光原子力显微镜观察肌动蛋白体外自组织纤维结构多态性的初步研究. 激光生物学报, 2004(4): 253-257
Zhang J, Wang Y L, He C L, *et al.* Journal of Laser Biology, 2004(4): 253-257
- [16] Martin-Fernandez M, Clarke D T, Tobin M J, *et al.* Preformed oligomeric epidermal growth factor receptors undergo an ectodomain structure change during signaling. Biophysical Journal, 2002, **82**(5): 2415-2427
- [17] Wertheimer N, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. American Journal of Epidemiology, 1979, **109**(3): 273-284
- [18] Chhabra D, Dos Remedios C G. Actin: An overview of its structure and function. Protein Reviews, 2008, **8**: 1-15
- [19] 朱钦士. 细胞中的“闹市”. 生物学通报, 2014, **49**(2): 18-22
Zhu Q S. Biological Bulletin, 2014, **49**(2): 18-22
- [20] 赵 昆, 黄康权. 极低频磁场的生物学效应. 自然杂志, 2002, **24**(6): 311-314
Zhao K, Huang K Q. Nature magazine, 2002, **24**(6): 311-314
- [21] Otterbein L R, Graceffa P, Dominguez R. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. Science, 2001, **293**(5530): 708-711
- [22] Noriko Kanzaki, Taro Q P Uyeda, Kazuo Onuma. Intermolecular interaction of actin revealed by a dynamic light scattering technique. Physical Chemistry, 2006, **110**(6): 2881-2887
- [23] Zhong C, Zhang X, Xu Z J, *et al.* Effects of low-intensity electromagnetic fields on the proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow stromal cells. Physic Therapy, 2012, **92**(9): 1208-1219
- [24] Reale M, Kamal M A, Patruno A, *et al.* Neuronal cellular responses to extremely low frequency electromagnetic field exposure: implications regarding oxidative stress and neurodegeneration [J/OL]. American: PLOS ONE, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4134243/pdf/pone.0104973.pdf>
- [25] Santoro N, Lisi A, Pozzi D, *et al.* Effect of extremely low frequency (ELF) magnetic field exposure on morphological and biophysical properties of human lymphoid cell line (Raji). BBA-Molecular Cell Research, 1997, **1357**(3): 281-290
- [26] Delle Monache S, Alessandro R, Iorio R, *et al.* Extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) induce *in vitro* angiogenesis process in human endothelial cells. Bioelectromagnetics, 2008, **29**(8): 640-648
- [27] Elentero A M, Amici M, Bonfili, *et al.* 50 Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance protein carbonyl groups content in cancer cells: effects on proteasomal systems [J/OL]. American: Hindawi Publishing Corporation, 2009. <http://dx.doi.org/10.1155/2002/834239>

A Preliminary Study on The Frequency Effects of Weak Extremely Low Frequency Magnetic Field on Cellular Actin Skeleton Assembly*

DU Juan¹⁾, WU Xia^{1,2,3)}, QI Hong-Xin¹⁾, SONG Wei-Tao¹⁾, WANG Zhi-Dan¹⁾, RAO Ling-Yue¹⁾,
ZHANG San-Jun³⁾, CHEN Shu-De¹⁾, XIA Ruo-Hong^{1,2,3)**}

¹⁾ Biophysics Laboratory, Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200241, China;

²⁾ Optics Laboratory, Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200241, China;

³⁾ State Key Laboratory of Precision Spectroscopy, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract In previous researches we have found that the 50 Hz magnetic field (MF) had significant effects on depressing the content and the assembly rate of cellular actin cytoskeleton, and the morphology of cells also was changed. In this study, the relationship between the frequency of extremely low frequency (ELF) MF and the field-induced-cytoskeleton effects was investigated. Since G-actin is charged particle, the electromagnetic field may affect the velocity and orientation of G-actin's movement, and then finally disturb F-actin assembly process. With various frequencies, the field exposure may cause different interference results. In this study, we exposed five specific frequencies (35 Hz, 50 Hz, 70 Hz, 110 Hz, and 140 Hz) of 0.4 mT MF to FL cells and monomer actin protein for 30 min, and by using immunofluorescence technique we detected the changes of microfilament content in FL cells corresponding to the five frequencies, to see if any specific frequency MF exert stronger effect on the skeleton than others. Furthermore, fluorescence resonance energy transfer technology (FRET) was employed to verify if this possible frequency window had a remarkable effect on the efficiency of F-actin assembly *in vitro*. The results showed that within cells, the 50 Hz MF-exposed group had the lowest F-actin content, with a reduction of $(34.66 \pm 3.14)\%$ compared to the Sham group, followed by the 110 Hz group, while the 35 Hz, 70 Hz, 140 Hz groups had no significant differences comparing with the Sham. In the FRET experiment, after exposing to the 0.4 mT 50 Hz MF, the FRET efficiency reduced significantly compared with the sham, 35 Hz, 70 Hz groups. The theoretical analysis showed that with exposed to the MF, F-actin assembly was mainly interfered by the induced-electric field force and the corresponding Lorentz force, under which the efficiency of the microfilament assembly decreased with a MF frequency dependent manner. Due to the coincidence that the time cycles of 50 Hz MF varying in its direction/strength is similar to that of actins binding to actin-microfilaments, we propose that 50 Hz is likely to be one of the MF frequency windows for the MF-induced-interference to cytoskeleton.

Key words PFMF, frequency, G-actin, F-actin, the Lorentz force, the electric field force

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0131

*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2011CB503703).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-54342955, E-mail: xiaruohong@163.com

Received: April 30, 2015 Accepted: July 7, 2015