

· 基础研究 ·

低频电刺激诱导外周血干细胞增殖并向施万细胞分化的实验研究

顾旭东 柏京 张成文 傅建明 王晶 潘文平

【摘要】目的 探讨体外培养下低频电刺激诱导外周血干细胞增殖并向施万细胞(SC)分化的可能机制。**方法** 原代培养 SD 大鼠外周血干细胞,将传至第 3 代的 SD 大鼠外周血干细胞分为低频电刺激组、细胞外信号调节激酶(ERK)组、联合应用组、对照组。4 组细胞均采用含 2% 胎牛血清的达尔伯改良伊格尔培养基(DMEM)进行培养,加入 SC 上清液后,低频电刺激组给予 1 h 持续低频电刺激,ERK 组在 DMEM 中加入浓度为 50 mmol/L 的抑制剂 PD98059,联合应用组在 ERK 组基础上给予 1 h 持续低频电刺激,对照组不行特殊干预处理。诱导前、后,利用噻唑蓝比色法检测 4 组细胞在 570 nm 处的吸光度 A 值,并采用 Western blot 法对诱导后各组细胞的增殖周期蛋白 D1(cyclin D1)及细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK4)含量进行测定。**结果** 干预前,各组外周血干细胞的 A_{750} 值无明显差异($P > 0.05$);干预后,低频电刺激组、ERK 组、联合应用组、对照组 A_{750} 值分别为(1.051 ± 0.058)、(0.363 ± 0.343)、(0.894 ± 0.343)、(0.758 ± 0.047),除 ERK 组外,其它各组 A_{750} 值均较干预前升高($P < 0.05$);各组 A_{750} 值组间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。诱导后,低频电刺激组 S-100、神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)及 P75 的表达率均高于其它各组($P < 0.05$),ERK 组各蛋白表达率则均低于其它各组($P < 0.05$),联合应用组 S-100、GFAP 及 P75 的蛋白表达率介于低频电刺激组与 ERK 组之间,高于 ERK 组,低于低频电刺激组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组组间 ERK 表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组比较,低频电刺激组和联合应用组磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(p-ERK1/2)、cyclin D1 及 CDK4 蛋白表达水平均较高($P < 0.05$),ERK 组则较低($P < 0.05$);与联合应用组比较,低频电刺激组 p-ERK1/2、cyclin D1 及 CDK4 蛋白表达水平较高($P < 0.05$),ERK 组较低($P < 0.05$)。**结论** 体外培养条件下,低频电刺激可促进 SD 大鼠外周血干细胞增殖并诱导其向 SC 分化,且 ERK 信号传导通路是促进 SC 增殖分化的途径之一。

【关键词】 外周血干细胞; 电刺激疗法; 施万细胞

Experimental study of proliferation and differentiation of peripheral blood stem cells into Schwann cells induced by low frequency electrical stimulation GU Xu-dong*, BAI Jing, ZHANG Cheng-wen, FU Jian-ming, WANG Jing, PAN Wen-ping. *Rehabilitation Medical Center, The Second Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314000, China

Corresponding author: FU Jian-ming, Email: fjm_7758@163.com

【Abstract】 Objective To investigate in vitro possible mechanisms by which low frequency electrical stimulation may stimulate peripheral blood stem cells' proliferation and differentiation into Schwann cells (SCs). **Methods** The original generation of peripheral blood stem cells was cultured using Sprague-Dawley (SD) rats. The third passage stem cells were divided into a low frequency stimulation group, an extracellular signal-regulated kinase (ERK) group, a combination group and a control group. All 4 groups were cultured in DMEM containing 2% fetal bovine serum by adding the SC supernatant. The low frequency electrical stimulation group was given 1 h of continuous low frequency stimulation. For the ERK group 50 mmol/L of the inhibitor PD98059 was added. The combination group was given the inhibitor plus 1h of sustained low frequency electrical stimulation. The control group received no special intervention. Before and after induction the 3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the absorbance value A of 4 cells at 570 nm (A_{750}), and after induction Western blotting was used to determine cyclin D1 (cyclin D1) and cyclin-dependent kinases (CDK4). **Results** Before the intervention peripheral blood stem cells in each group had no significant differences in their A_{750} values. After the intervention, the A_{750} values of the low frequency electrical stimulation, the ERK group, the

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.09.001

基金项目:浙江省嘉兴市科技计划项目(2010AY1034)

作者单位:314000 嘉兴,浙江省嘉兴市第二医院康复医学中心(顾旭东、柏京、傅建明、王晶、潘文平);嘉兴学院(张成文)

通信作者:傅建明,Email:fjm_7758@163.com

combination group and the control group were (1.051 ± 0.058) , (0.363 ± 0.343) , (0.894 ± 0.343) and (0.758 ± 0.047) , respectively. This showed a statistically significant increase for all groups except the ERK group. The differences among the groups were also statistically significant. The expression of S-100, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and P75 was highest in the low frequency electrical stimulation group, and in the ERK group they were the lowest. S-100, GFAP and P75 protein expression also was highest in the low frequency electrical stimulation group and lowest in the ERK group, and the inter-group differences were statistically significant. ERK expression showed no significant difference among the groups. Compared with the control group, the expression of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2), cyclin D1 and CDK4 protein in the low frequency electrical stimulation group and the combination group were all significantly higher and the protein expression in the ERK group was significantly lower. The p-ERK1/2, cyclin D1 and CDK4 protein levels in the combination group were significantly lower than in the low frequency electrical stimulation group and higher than in the ERK group. **Conclusions** Low frequency electrical stimulation can promote peripheral blood stem cell proliferation and induce cell differentiation into Schwann cells, at least in vitro. The ERK signaling pathways are part of the signaling pathways of the proliferation and differentiation.

【Key words】 Blood; Stem cells; Electrical stimulation; Schwann cells

周围神经损伤是临床上的常见疾病,致残率较高,促进神经再生和重建神经通路是其主要治疗手段^[1-3]。施万细胞(Schwann cell, SC)是周围神经系统的主要胶质细胞,在周围神经损伤、再生及修复过程中均占有重要地位^[4-5]。有研究报道^[6],应用低频电刺激促进患者残肢功能恢复可取得满意疗效。本研究采用低频电刺激对体外培养条件下的大鼠外周血干细胞进行干预,观察其增殖情况及向 SC 分化的相关指标状况,旨在探索其可能机制,为临床应用提供理论依据。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物:2 月龄健康清洁级 Sprague-Dawley (SD)大鼠 3 只,雌雄不限,体重 100 ~ 150 g,由嘉兴学院动物实验中心提供。

2. 实验试剂及仪器:RSC96 细胞株(美国典型菌种保藏库);噻唑蓝试剂、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、胰蛋白酶(Sigma 公司);达尔伯改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)/F12(Gibco 公司);胎牛血清(上海浩然生物技术有限公司);Percoll 细胞分离液(上海易佰聚生物);抗 S-100 蛋白多克隆抗体、抗神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、抗 p75 单克隆抗体(北京生物制品研究所);细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)信号通路抑制剂 PD98059(Tocris 公司);细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)均购于 Abcam 公司。SYS-A300 多通道电刺激仪(美国产)、Imark 酶联免疫检测仪(美国产)、恒温 CO₂ 培养箱(日本产)。

二、细胞分离及培养

1. RSC96 细胞株的培养及上清液制备:采用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养 RSC96 细胞株,每隔 3 ~ 4 d 换液 1 次,无血清培养 24 h 后,取其细胞培养液上清,以 1500 r/min 的速率离心 5 min,留取 SC 上清液,待用。

2. SD 大鼠外周血干细胞的分离及培养:将 SD 大鼠断头后收集外周血 5 ml,用 Percoll 细胞分离液(1.131 g/ml)分离外周血单个核细胞,采用流式细胞术进一步分离纯化,得到 CD34⁺/CD90⁺ 外周血干细胞,将其置于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中重悬,经过计数、离心后,调整细胞浓度至 6×10^5 个/cm²,接种于 25 ml 的无菌培养瓶中,于 5% CO₂ 浓度、恒温 37 ℃ 的细胞培养箱中培养。48 h 后进行第 1 次换液,之后每隔 3 ~ 4 d 半量换液 1 次,待细胞铺满瓶底达 80% ~ 90% 后,用 0.25% 胰酶消化传代。

三、分组及干预方法

取生长状态良好的第 3 代外周血干细胞,按 2×10^5 置于六孔板内,培养 1 d 后,加入大鼠 SC 上清液继续培养,24 h 后,将其分为低频电刺激组、ERK 组、联合应用组、对照组。4 组细胞均采用含 2% 胎牛血清的 DMEM 进行培养,参照文献[7]所设计的离体细胞电刺激技术,给予低频电刺激组 1 h 持续低频电刺激,刺激频率为 20 Hz,脉冲波宽为 100 μs,电流强度为 0.3 mA;ERK 组在 DMEM 中加入浓度为 50 mmol/L 的抑制剂 PD98059;联合应用组在 ERK 组基础上给予 1 h 持续低频电刺激;对照组不行特殊干预处理。

四、大鼠外周血干细胞的增殖情况检测

干预前、后,利用噻唑蓝法检测细胞增殖率。将对数生长期的外周血干细胞按照 5×10^5 个/ml 分组接种至 96 孔培养板中,每组 8 个复孔,每孔 100 μl 培养体系,置于 5% CO₂ 浓度、恒温 37 ℃ 的细胞培养箱中

培养 24 h 后,向每孔内加入 20 μ l 噻唑蓝试剂,孵育 4 h 后,再加入 DMSO 150 μ l,震荡 15 min,于酶标仪上检测各孔在 570 nm 处的吸光度 A 值。

五、免疫细胞化学染色

干预后,采用免疫细胞化学染色法对 SC 进行染色。用 0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS) (pH = 7.4)清洗 3 次,除去 PBS 液,在室温下以 4% 多聚甲醛固定 20 min,加入 1:100 稀释的抗 S-100 抗体、抗 GFAP 抗体和抗 P75 抗体,利用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合技术(streptavidin biotin-peroxidase complex method, SABC)进行二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,再以苏木素轻度复染后,置于光镜下选择 10 个不重叠视野($\times 200$)进行观察,计算阳性率。

六、Western blot 免疫印迹检测

干预后 24 h,用预冷 PBS 液冲洗 3 次,控干水分,加入细胞裂解液 200 μ l,吹打后转入 1.5 ml 离心管中,于冰上静置 30 min,在 4 $^{\circ}$ C 环境下,以 12 000 r/min 的速度离心 10 min,取上清液采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度,对蛋白质进行定量分析。加入 5 $\times$ 加样缓冲液以 4:1 的比例稀释,煮沸 6~8 min,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。取蛋白样品 30 μ l 于 10% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,恒压 25 V,跑浓缩胶 50 min 后,转移至硝酸纤维素滤膜上,用封闭缓冲液(5% 脱脂牛奶)封闭 1 h。将膜放入用 5% 封闭液稀释的 cyclin D1 和 CDK4 中,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,置于摇床上室温孵育 2 h。TBST 洗膜 3 次后,加入辣根过氧化物酶标记的第 II 抗体,室温继续作用 2 h,再次经 TBST 洗膜后,加入新鲜配制的增强化学发光 ECL 显色液,1 min 后封入保鲜膜中,压片,显影于感光胶片上。

七、统计学分析

采用 Stata 7.0 版统计学软件进行数据分析,所有数据均采用($\bar{x} \pm s$)形式表示,组间比较采用方差检验分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠干预前、后外周血干细胞的增殖活性

干预前,各组外周血干细胞的 A_{750} 值无明显差异($P > 0.05$)。与干预前比较,ERK 组 A_{750} 值下降,增殖活性减弱($P > 0.05$)。低频电刺激组、联合应用组及对照组干预后 A_{750} 值较干预前升高,增殖活性显著增强($P < 0.05$),且与对照组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),低频电刺激组、ERK 组干预后 A_{750} 值与联合应用组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),低频电

刺激组干预后 A_{750} 值显著高于 ERK 组,差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠干预前、后外周血干细胞在 570 nm 处的吸光度 A 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	干预前 A_{750}	干预后 A_{750}
低频电刺激组	0.525 $\pm$ 0.169	1.051 $\pm$ 0.058 ^{abcd}
ERK 组	0.561 $\pm$ 0.144	0.363 $\pm$ 0.343 ^{abc}
联合应用组	0.530 $\pm$ 0.144	0.894 $\pm$ 0.343 ^{ab}
对照组	0.513 $\pm$ 0.153	0.758 $\pm$ 0.047 ^a

注:与干预前比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$;与联合应用组比较,^c $P < 0.05$;与 ERK 比较,^d $P < 0.05$

二、各组大鼠干预后外周血干细胞的蛋白表达率

低频电刺激组 S-100、GFAP 及 P75 的蛋白表达率均高于其它各组($P < 0.05$),ERK 组各蛋白表达率则均低于其它各组($P < 0.05$),联合应用组 S-100、GFAP 及 P75 的蛋白表达率介于低频电刺激组与 ERK 组之间,高于 ERK 组但低于低频电刺激组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠干预后外周血干细胞的蛋白表达率(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	S-100 蛋白表达率	GFAP 蛋白表达率	P75 蛋白表达率
低频电刺激组	35.25 $\pm$ 7.22 ^{abc}	43.00 $\pm$ 7.84 ^{abc}	36.38 $\pm$ 3.28 ^{abc}
ERK 组	17.13 $\pm$ 3.98 ^{ab}	22.75 $\pm$ 3.80 ^{ab}	15.86 $\pm$ 2.98 ^{ab}
联合应用组	28.13 $\pm$ 2.80 ^a	36.50 $\pm$ 5.10 ^a	29.50 $\pm$ 6.27 ^a
对照组	22.88 $\pm$ 3.55	29.63 $\pm$ 5.32	23.63 $\pm$ 4.82

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与联合应用组比较,^b $P < 0.05$;与 ERK 组比较,^c $P < 0.05$

三、免疫印迹检测结果比较

各组 ERK1/2 表达量之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较,低频电刺激组和联合应用组磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(phosphorylation extracellular signal regulated kinase1/2, p-ERK1/2)、cyclin D1 及 CDK4 蛋白表达水平均较高($P < 0.05$),ERK 组则较低($P < 0.05$)。与联合应用组比较,低频电刺激组 p-ERK1/2、cyclin D1 及 CDK4 蛋白表达水平较高($P < 0.05$),ERK 组较低($P < 0.05$)。详见图 1。

讨 论

低频电刺激可促进周围神经损伤修复,SC 是参与其修复的重要细胞成分之一,目前周围神经损伤修复在一定程度上依赖于 SC 的生理作用^[8]。有研究发现^[9],外周血干细胞是一种具有多向分化潜能的干细胞,在特定条件下可增殖分化为 SC,进而促进周围神经组织实现自我修复。本研究利用 SD 大鼠外周血干细胞模拟 SC 生存的微环境,在体外培养条件下,予以各组细胞低频电刺激、ERK1/2 抑制剂 PD98059 等不同干预手段,干预后测定各组细胞在 570 nm 处的吸光

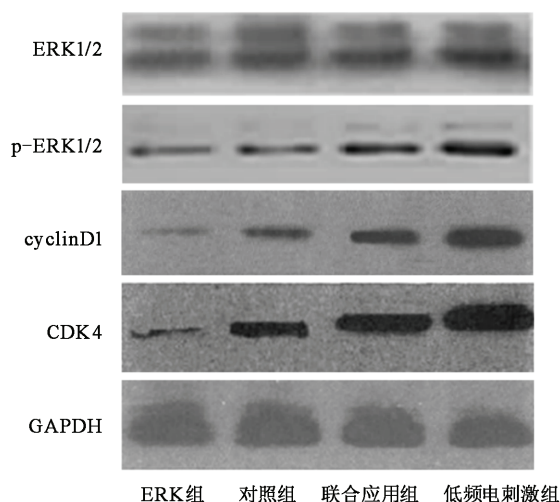


图1 各组细胞 Western blot 免疫印迹检测结果比较

度 A 值,以间接反映细胞的增殖能力。结果发现,除 ERK 组外,低频电刺激组、联合应用组及对照组 A_{750} 值均较干预前增加,且以低频电刺激组 A_{750} 值增加幅度最为显著,提示低频电刺激在一定程度上能促进 SD 大鼠外周血干细胞增殖。通过进一步免疫化学检测,发现 S-100、GFAP、P75 的蛋白表达率显著增加,且与低频电刺激之间存在一定相关性,证明低频电刺激可促进 SD 大鼠外周血干细胞向 SC 分化,但最佳刺激时间及刺激频率尚需进一步研究探讨。

研究表明^[10-11],神经调节蛋白(neuregulin, NRG)是在结构上相似的多肽家族,其可激活 ErbB 受体酪氨酸激酶,经接头蛋白 Shc 和 Grb2 将信号传递至下游的 Ras/Raf/MEK/ERK 细胞信号传导通路,从而调控细胞的基因转录,产生多种生物学活性,参与神经系统发育及损伤后 SC 的增殖和迁移过程,并影响髓鞘形成。鉴于上述结论,本研究在选择干预方式时,除选用低频电刺激外,还在此基础上加入 ERK 阻断剂,结果发现,ERK 信号传导通路被阻断后,外周血干细胞的增殖活性显著降低,向 SC 分化的能力也呈现出一致性下降趋势,提示 ERK 信号传导通路是 SC 增殖分化的途径之一。值得注意的是,干预后联合应用组的细胞增殖活性高于未给予任何处理的对照组,说明 ERK 信号通路被阻断后,SD 大鼠外周血干细胞增殖分化的能力并未完全丧失,仍可进行自我增殖分化,提示除 ERK 信号传导通路外,低频电刺激还能通过其它信号传导途径诱导外周血干细胞实现增殖分化。激活 SC 内蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 信号传导途径后,可引起 SC 内环化腺苷酸的含量增加,从而引起胞内促分裂因子髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)的表达水平上调,最终表现出 SC 的促增殖效应^[12-13]。由此推测,除 ERK 信号传导通路外,PKA 信号传导通路是低频电刺激诱导外周血干细胞增殖分化的又一可能途径。

cyclin D1 及 CDK4 是细胞增殖周期中的重要蛋白分子,具有维持正常细胞周期的生理作用。本研究发现,低频电刺激后细胞内 cyclin D1 及 CDK4 的表达量显著增加,再次验证了低频电刺激可通过 ERK 信号传导通路促进外周血干细胞增殖。

综上所述,本研究利用低频电刺激对大鼠外周血干细胞进行干预,发现低频电刺激具有促进外周血干细胞增殖的作用,在特定条件下可通过 ERK 信号转导通路诱导其向 SC 分化,但这一过程中是否存在其它信号转导途径发挥协同作用,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Siemionow Maria, Sari A. A contemporary overview of peripheral nerve research from the Cleveland Clinic microsurgery laboratory. *Neurol Res*, 2004, 26: 218-225.
- [2] Zochodne DW, Cheng C. Neurotrophins and other growth factors in the regenerative milieu of proximal nerve stump tips. *J Anat*, 2000, 196: 279-283.
- [3] Sørensen J, Haase G, Krarup C, et al. Gene transfer to Schwann cells after peripheral nerve injury: a delivery system for therapeutic agents. *Ann Neurol*, 1998, 43: 205-211.
- [4] Houstava L, Dubový P, Haninec P, et al. An alternative preparation of the acellular muscle graft for reconstruction of the injured nerve--morphological and morphometric analysis. *Ann Anat*, 1999, 181: 275-281.
- [5] Golden KL, Pearse DD, Blits B, et al. Transduced Schwann cells promote axon growth and myelination after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2007, 207: 203-217.
- [6] 吴朝阳, 王凯, 胡永善, 等. 低频电刺激辅助治疗脑卒中患者上肢功能障碍的随机对照研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2010, 32: 696-697.
- [7] 夏蓉. 离体的细胞外电刺激装置的优化和验证. *神经解剖学杂志*, 2007, 23: 489-494.
- [8] Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38: 1995-1999.
- [9] 何红云, 邓仪昊, 佟晓杰, 等. 骨髓间充质细胞构建组织工程神经修复坐骨神经缺损. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13: 5562-5565.
- [10] Lai C. Peripheral glia: Schwann cells in motion. *Curr Biol*, 2005, 15: 332-334.
- [11] Garratt AN, Britsch S, Birchmeier C. Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays*, 2000, 22: 987-996.
- [12] Wang TT, Tio M, Lee W, et al. Neural differentiation of mesenchymal-like stem cells from cord blood is mediated by PKA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357: 1021-1027.
- [13] Tzeng SF, Deibler GE, Neuberger TJ, et al. Two mitogenic regions of myelin basic protein interact with different receptors to induce Schwann cell proliferation in a cAMP dependent process. *J Neurosci Res*, 1995, 42: 758-767.

(修回日期: 2013-07-20)

(本文编辑: 凌 琛)