

双相脉冲电刺激对大鼠嗅球神经干细胞增殖及分化的影响

王梦航

【摘要】 目的 观察双相脉冲电刺激对嗅球神经干细胞增殖及分化的影响。方法 从新生 1 天的大鼠嗅球组织分离、培养、传代及鉴定嗅球神经干细胞;实验分为对照组和电刺激组。电刺激组利用双相脉冲电刺激细胞培养装置,使嗅球神经干细胞连续 24 h 暴露于双相脉冲电刺激加载环境,脉冲宽度为 8 ms,并按脉冲强度的不同分为 50 mV 组和 100 mV 组;对照组:未暴露于电刺激加载环境。采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT 法)和免疫荧光染色技术分别检测嗅球神经干细胞在双相脉冲电刺激下细胞增殖及分化的影响。结果 50 mV 组及 100 mV 组的细胞活力及 GFAP 阳性染色细胞数均较对照组明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);50 mV 组明显高于 100 mV 组($P < 0.05$)。结论 双相脉冲电刺激可促进嗅球神经干细胞的增殖及分化,因而有可能成为干细胞移植的一种辅助方法。

【关键词】 电刺激; 嗅球; 神经干细胞; 增殖; 分化; 神经损伤

基金项目: 国家自然科学基金科学基金项目(11202018);中国博士后科学基金项目(20110490269, 2013T60055);北京大学国际医院内科研基金(YN2016QN03)

Effect of biphasic electrical stimulation on the proliferation and differentiation of olfactory bulb neural precursor cells Wang Menghang. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Peking University International Hospital, Peking University, Beijing 102206, China

Corresponding author: Wang Menghang, Email: menghangwang@buaa.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effect of biphasic electrical stimulation (BES) on the proliferation and differentiation of rats olfactory bulb neural precursor cells (OB NPCs). **Methods** OB NPCs of one day old neonatal rats were isolated, cultured, passaged and identified. They were randomly divided into a control group and an electrical stimulation (ES) group. The OB NPCs in the ES group were exposed to BES with a 50 mV/mm or 100 mV/mm electric field for 24 hours with a pulse width of 8 ms, while the control group was not given electrical stimulation. The immunofluorescent technique and 3(4, 5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay were used to assess the cells' proliferation and differentiation. **Results** The cell viability and the number of glial fibrillary acidic protein positive cells in the ES group were significantly higher than in the control group. **Conclusions** BES may be used as an auxiliary technique for improving cell survival and differentiation in stem cell-based transplantation therapy as it can promote proliferation and differentiation, at least of OB NPCs.

【Key words】 Electrical stimulation; Olfactory bulb; Neural stem cells; Proliferation; Differentiation; Neural repair; Neural regeneration; Nerve injury

Fund program: National Natural Science Foundation of China (grant 11202018); Post-doctoral Foundation of China (grants 20110490269, 2013T60055); Peking University International Hospital Research Fund (grant YN2016QN03)

引起中枢神经损伤的疾病有很多,包括外伤、阿尔茨海默病、帕金森病、肿瘤、内分泌性疾病、感染性疾病等,嗅球神经干细胞移植修复中枢神经损伤被认为是目前最具潜在临床应用价值的方法之一^[1-4]。然而该方法目前遇到的困难是干细胞植入损伤神经后不易存

活及定向分化困难^[5]。Baba 等^[6]的研究表明,电刺激信号是诱导神经元生长、分化、迁移的重要信号分子,电信号负荷的变化影响细胞膜上的离子门控通道活性,促进生物因子的释放,从而修复损伤的神经环路及重建神经功能,但具体机制尚未完全明确。本实验旨在研究双相脉冲电刺激对嗅球神经干细胞增殖及分化的影响,探索双相脉冲电刺激在中枢神经损伤干细胞移植治疗中的辅助应用潜能。

材料与amp;方法

一、实验动物

新生 1 d 的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 20 只,由北京大学实验动物中心所提供。

二、细胞培养试剂

改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)/F12 培养液 (Invitrogen, 美国), 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) (Sigma, 美国), 0.125% 胰蛋白酶及碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 购自美国 Invitrogen 公司, Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) (HyClone, 美国), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Hyclone, 美国), 2% 戊巴比妥钠 (Sigma, 美国)。

三、免疫细胞化学试剂

烟酸已可碱 Hoechst 33342 以及四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 购自美国 Sigma 公司, 一抗包括小鼠抗神经巢蛋白 (nestin) 单抗, 兔抗 Musashi (神经特异性 RNA 结合蛋白) 单抗购自美国 Chemicon 公司, SABC 试剂盒购自武汉博士德公司, 兔抗胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 多抗 (Chemicon 公司)。

四、嗅球神经干细胞的分离和培养

新生 1 d 的 SD 大鼠 20 只, 脱颈处死后放置于冰盐水中。在解剖显微镜下剪开顶骨向两侧前上钝性分离至暴露嗅球区, 观察并分离新生大鼠的嗅球组织; 取出鼠脑前部的嗅球组织, 放置于冰上 HBSS 中, 通过漂洗 2 次后剪成小碎块, 0.125% 胰蛋白酶 37 °C 消化 25 min, 并且每 5 min 震荡 1 次, 后离心 (1000 r/min) 5 min。用 100 目铜网过滤, 制成单细胞悬液, 台盼蓝染色并细胞计数, 并接种于细胞培养皿中, 置于体积浓度为 5% 二氧化碳 (CO₂) 的培养箱 (37 °C) 内培养。每隔 7 d 换取培养液 1 次, 并隔天加入 bFGF 和 EGF 促进增殖。

五、嗅球神经干细胞的传代及鉴定

每隔 7 d 后收集细胞球, 按 1×10⁵ 个/ml 细胞密度接种于 60 mm 塑料细胞培养皿并按同样细胞密度传代。使用第 2 代含细胞球状物的培养液滴在多聚赖氨酸预处理的盖玻片上, 37 °C 孵育, 2 h 取出, 用 4% 多聚甲醛 (0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS), pH7.4) 固定 20 min。一抗为小鼠抗 nestin 单抗 (浓度 1:500), 一抗为兔抗 Musashi 单抗 (浓度 1:500), Cy3 标记荧光二抗 (浓度 1:250), 一抗过夜, 加入二抗后 40 min, 烟酸已可碱 Hoechst 33342 (浓度 1:1000), 室温 10 min, 在 37 °C 培养, 5% CO₂ 孵箱

中孵育 10 min, PBS 清洗 1 次, 全程避光操作; 阴性对照以 PBS 代替一抗。荧光显微镜下观察并采集图像。

六、体外电刺激细胞培养装置

(一) 双相脉冲电刺激体外加载装置的组成

双相脉冲模式电刺激体外加载装置的组成主要分为 3 大部分: ① 灌流系统, 下游储液瓶、上游储液瓶、三通和滤器共同构成培养液灌流系统, 为培养小室内的细胞生长提供细胞培养液; ② 电刺激系统, 通过两根导线将导电玻璃连接到电刺激发生器, 为培养小室内的细胞生长加载不同模式的电刺激; ③ 细胞培养小室, 用于提供细胞生长所需空间。本装置的培养液灌流系统和细胞培养小室都置于培养箱中, 以保持适于细胞生长的 CO₂ 浓度和有湿度的空气环境。如图 1 所示。

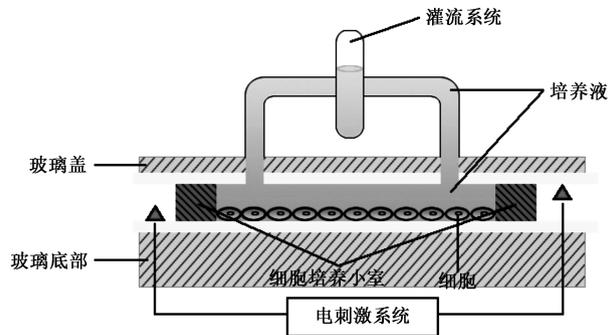


图 1 双相脉冲电刺激体外加载装置的组成

(二) 电刺激加载条件及分组

电刺激脉冲由 AFG3000 型刺激器 (Tektronix, 美国) 产生, 是一种直流电源调制产生的双相恒流脉冲。实验分为对照组和电刺激组。电刺激组: 将传代的神经干细胞连续 24 h 暴露于双相脉冲电刺激加载环境, 脉冲宽度为 8 ms, 并按脉冲强度的不同分为 50 mV 组和 100 mV 组; 对照组: 未暴露于电刺激加载环境。

七、MTT 法检测电刺激后细胞的增殖能力

电刺激加载后收集神经干细胞, 将收集的细胞配制成单细胞悬液, PBS 洗 3 次, 以每孔 2×10⁴ 个细胞接种于 96 孔板, 每孔加 MTT 20 μl, 培养 4 h 后弃去上清液, 每孔加入二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 100 μl, 震荡摇匀, 使孔内蓝紫色结晶充分溶解, 酶标仪 (λ=490 nm) 测吸光度值; 测定出各组细胞活力。

八、电刺激对分化潜能的影响

培养细胞经过处理后, 预冷 PBS 洗去残留培养基, 4% 多聚甲醛固定 30 min。0.25% 聚乙二醇辛基苯基醚-100 (octyl phenoxy poly ethoxy 100, Triton X-100) 处理 5 min。一抗 (GFAP 抗体, 稀释度 1:500) 4 °C 过夜。二抗 (稀释度 1:250) 室温孵育 1 h。荧光显微镜采集图片。为观察 GFAP 在细胞中的定位, 在二抗孵育后, 以 5 μg/ml 的烟酸已可碱 Hoechst 33342 孵育标

本 5 min, 然后封片观察。光镜下烟酸已可碱 Hoechst 33342 与 DNA 双链结合, 可被激发出蓝色荧光, 显示细胞核所在位置。

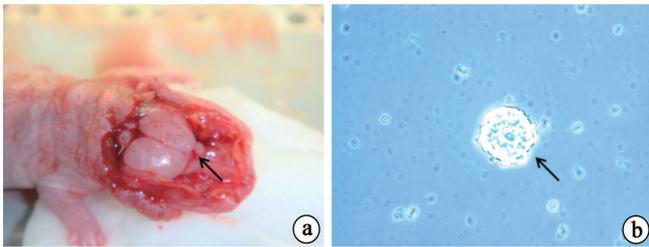
九、统计学方法

使用 SPSS 13.0 版统计软件对数据进行统计学分析处理, 采用单向方差分析法 (ANOVA) 以及 Turkey's 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、嗅球神经干细胞形态学表现

新生大鼠嗅球组织外观为圆锥形, 位于大脑前部成分叉状, 应用显微外科镊子可以轻巧剥离 (图 2a), 取出的嗅球组织切碎并制备为单细胞混悬液培养; 每隔 1 天后加入神经干细胞营养因子, 2 d 后细胞开始分裂并聚集成团, 呈椭圆形和圆形, 少量细胞开始分化, 4~7 d 后进入第 2 代嗅球神经干细胞, 可见细胞球数目增多, 体积增大, 细胞克隆出现, 镜下为圆形或椭圆形的干细胞球 (图 2b)。

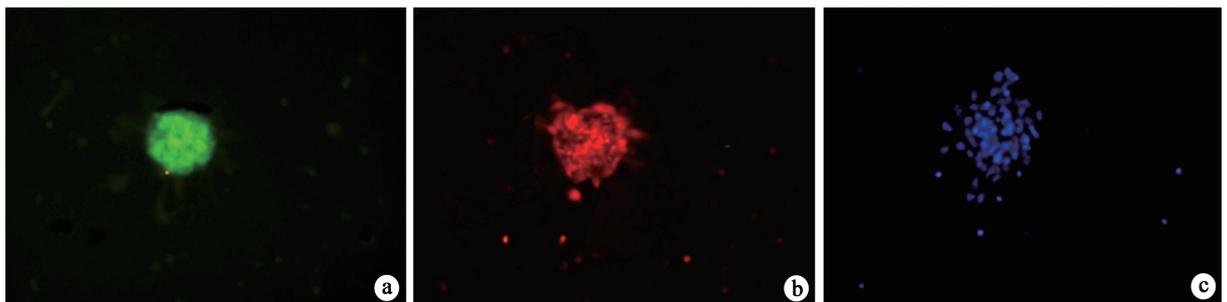


注: 图 a 箭头示大鼠嗅球所在位置; 图 b 箭头示圆形或椭圆形的干细胞球 ($\times 100$)

图 2 分离嗅球组织的大体观及培养 7 d 后嗅球神经干细胞

二、嗅球神经干细胞的鉴定

取二代以上嗅球干细胞进行免疫荧光染色, 可见大多数细胞球抗 nestin 免疫反应阳性 (图 3a); 并呈现 Musashi 免疫反应阳性 (图 3b), 该染色可作为嗅球神经干细胞的特异性标记蛋白; 几乎所有的细胞克隆可以被 Hoechst 33342 细胞核标记呈蓝色 (图 3c)。

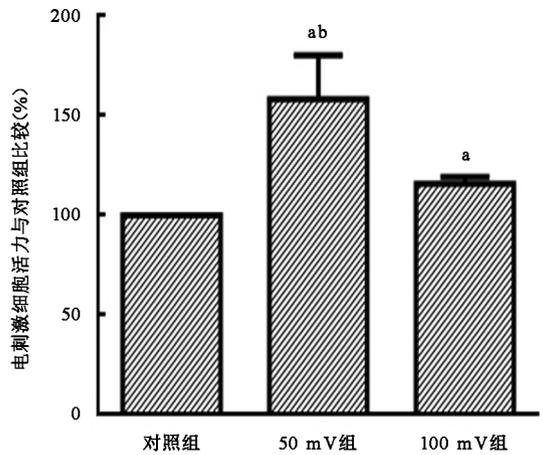


注: 图 a 为嗅球干细胞球 nestin 免疫反应阳性; 图 b 为 Musashi 免疫反应阳性; 图 c 为 Hoechst 33342 标记核呈蓝色

图 3 嗅球神经干细胞的鉴定 (免疫荧光染色, $\times 100$)

三、双相脉冲模式电刺激对嗅球神经干细胞活力的影响

实验组的 50 mV 组及 100 mV 组的细胞活力较高, 50 mV 组高于 100 mV 组 (图 4), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: 与对照组比较, $^a P < 0.05$; 与 100 mV 组比较, $^b P < 0.05$

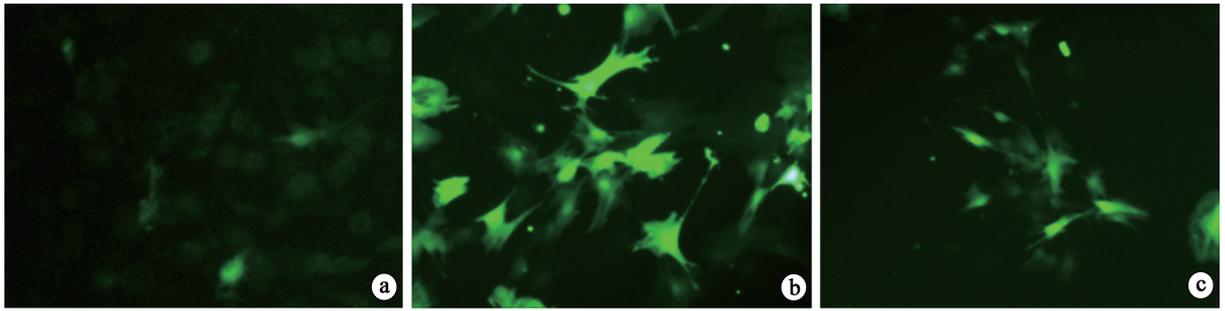
图 4 双相脉冲电刺激对嗅球神经干增殖的影响

四、双相脉冲模式电刺激对嗅球神经干细胞分化潜能的影响

双相脉冲电刺激 24 h 后, 实验组 GFAP 染色阳性细胞数量明显增加 (图 5), 50 mV 组高于 100 mV 组 (图 6), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 6)。

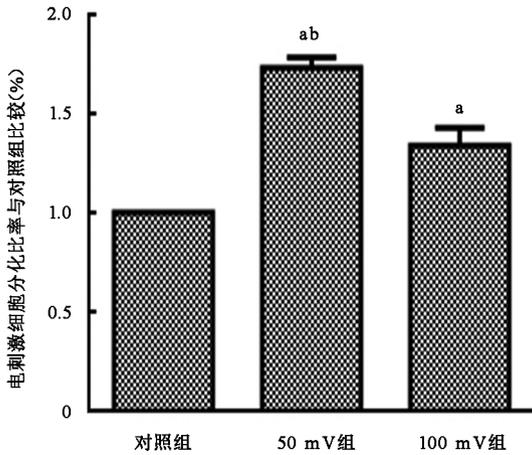
讨 论

电场环境是生物所处的重要外部微环境之一, 生物电现象是生命活动的根本属性, 机体的一切生命活动都伴随着生物电的产生。Ingvar^[7] 研究组尝试了电流刺激对神经细胞发育影响的研究, 使得外加电刺激对细胞活性的影响已越来越引起人们的兴趣和重视。2006 年 Huang 等^[8] 用取自胚胎嗅球的组织分离纯化培养成的嗅神经来源的单细胞悬液, 对 300 例晚期脊髓损伤患者进行了治疗, 发现胚胎嗅神经来源细胞移植能快速帮助晚期脊髓损伤患者恢复部分神经功能。



对照组 50 mV 组 100 mV 组

图 5 3 组嗅球神经干细胞抗 GFAP 染色阳性细胞数比较(免疫荧光染色,×100)



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 100 mV 组比较,^b $P < 0.05$

图 6 双相脉冲电刺激对嗅球神经干细胞分化潜能的影响

从而电刺激被认为是干细胞移植修复中枢神经损伤疾病中最有前景的辅助治疗之一。

本研究发现,双相脉冲电刺激能促进嗅球神经干细胞的增殖,电刺激实验组的 GFAP 阳性细胞均较对照组明显增加,且 50 mV 组明显高于 100 mV 组 ($P < 0.05$),说明双相脉冲电刺激能促进干细胞向星形胶质细胞方向分化。近年的研究表明,GFAP 阳性的胶质细胞可以促进轴突生成及神经再生^[9],本研究中,电刺激嗅球神经干细胞分化 7 d 后,可见 GFAP 阳性细胞增多,形态类似星形胶质细胞,这表明神经干细胞的一个分化方向是星形胶质细胞,进一步说明外界“微环境”的影响,特别是电刺激信号,对于神经干细胞的分化具有重要的调控作用。而电刺激是调节细胞功能的一个重要因素,并且细胞内存在通过接收电刺激传导的信号通路^[10]。综上所述,双相脉冲电刺激可以促进嗅球神经干细胞的增殖及分化,因而有可能作为一种神经干细胞移植的辅助方式,用于中枢神经系统损伤性疾病的治疗。

参 考 文 献

[1] Khankan RR, Griffis KG, Haggerty-Skeans JR, et al. Olfactory en-

sheathing cell transplantation after a complete spinal cord transection mediates neuroprotective and immunomodulatory mechanisms to facilitate regeneration[J]. *J Neurosci*, 2016, 36(23): 6269-6286. DOI: 10.1523/jneurosci.0085-16.2016.

[2] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke[J]. *Nat Med*, 2002, 8(89): 63-70. DOI: 10.1038/nm747.

[3] Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, et al. Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(5): 1657-1676. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3111-09.2010.

[4] Borlongan CV. Recent preclinical evidence advancing cell therapy for Alzheimer's disease[J]. *Exp Neurol*, 2012, 237(1): 142-146. DOI: 10.1016/j.expneurol.2012.06.024.

[5] Li P, Tessler A, Han SS, et al. Fate of immortalized human neuronal progenitor cells transplanted in rat spinal cord[J]. *Arch Neurol*, 2005, 62(2): 223-229. DOI: 10.1001/archneur.62.2.223.

[6] Baba T, Kameda M, Yasuhara T, et al. Electrical stimulation of the cerebral cortex exerts antiapoptotic, angiogenic, and anti-inflammatory effects in ischemic stroke rats through phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. *Stroke*, 2009, 40(11): e598-e605. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.563627.

[7] Ingvar S. Reaction of cells to galvanic current in tissue culture[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1920, (17): 198-199.

[8] Huang H, Chen L, Wang H, et al. Safety of fetal olfactory ensheathing cell transplantation in patients with chronic spinal cord injury. A 38-month follow-up with MRI[J]. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2006, 20(4): 439-443.

[9] Filous AR, Miller JH, Coulson-Thomas YM, et al. Immature astrocytes promote CNS axonal regeneration when combined with chondroitinase ABC[J]. *Dev Neurobiol*, 2010, 70(12): 826-841. DOI: 10.1002/dneu.20820.

[10] Wenjin W, Wenchao L, Hao Z, et al. Electrical stimulation promotes BDNF expression in spinal cord neurons through Ca(2+)- and Erk-dependent signaling pathways[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(3): 459-467. DOI: 10.1007/s10571-010-9639-0.

(修回日期:2016-12-23)

(本文编辑:汪 玲)