

网络出版时间: 2016-07-12 11:12:57

·基础研究·

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1329.R.20160712.1112.002.html>

不同电刺激信号对大鼠雪旺细胞增殖的影响

王宇^{1,2}, 付川^{1,3}, 危岩⁴, 章培标¹

摘要:目的 研究不同的电刺激信号对大鼠雪旺细胞(RSC96)增殖的影响。方法 实验使用RSC96细胞系(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库),经过2次传代培养,以 1.25×10^4 /孔的密度种植于24孔细胞培养板中,次日电刺激信号分别采用不同的电压(10、100、500、1 000、5 000、10 000 mV/cm)、不同的频率(0.1、1.0、100.0、1 000.0、10 000.0、1 000 000.0 Hz)、不同的脉冲占空比(5%、10%、30%、50%、70%、90%)及不同的波形(正脉冲波、矩形波、三角波、正弦波、杂波、直流波)对细胞进行电刺激,每组设置3个平行样,细胞每天刺激30 min,持续刺激4 d。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖率。结果 当电刺激频率为100.0 Hz、脉冲占空比为50%、波形为矩形波时,电压 > 500 mV/cm时对细胞的增殖具有抑制作用。当电刺激频率为100.0 Hz、脉冲占空比为50%、电压为500 mV/cm时,正脉冲波、正弦波、矩形波和三角波都能够促进细胞的增殖。当电刺激波形为矩形波、脉冲占空比为50%、电压为500 mV/cm时,频率100.0~1 000.0 Hz组细胞增殖率最高。当电刺激波形为矩形波、频率为100.0 Hz、电压为500 mV/cm时,不同的脉冲占空比对细胞增殖的影响不明显。结论 不同的电刺激信号条件对细胞增殖的影响较大。电压 ≤ 500 mV/cm、有规律的脉冲波形、频率为100.0~1 000.0 Hz电刺激信号能够获得较好的RSC96增殖的效果。实验所获得的优化电刺激参数在外周神经修复中具有非常大的应用前景。

关键词: 电刺激;雪旺细胞;细胞增殖;外周神经

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:1009-7090(2016)04-0335-04

DOI:10.13339/j.cnki.sglc.20160712.001

Effect of different electrical stimulation parameters on rat Schwann cell proliferation WANG Yu^{1,2}, FU Chuan^{1,4}, WEI Yen³, ZHANG Pei-biao¹ (1. Key Laboratory of Polymer Ecomaterials, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, Jilin, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Department of Spinal Surgery, Second Hospital, Jilin University, Changchun 130041, Jilin, China; 4. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Corresponding author: ZHANG Pei-biao. E-mail: Zhangpb@ciac.ac.cn. WEI Yen. E-mail: weiyen@tsinghua.edu.cn.

Abstract: Objective To study the effect of different electrical stimulation (ES) parameters on the proliferation of rat Schwann cells(RSC96). **Methods** RSC96 cells were obtained from the Cell Culture Centre of Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences. The cells at passage 2 were seeded into the 24 wells plate at initial seeding density of 1.25×10^4 cells/well. Next day, RSC96 cells were stimulated by different ES amplitude(10, 100, 500, 1 000, 5 000, and 10 000 mV/cm), frequency(0.1, 1.0, 100.0, 1 000.0, 10 000.0 and 1 000 000.0 Hz), duty cycle(5%, 10%, 30%, 50%, 70% and 90%) and waveform (positive pulse, rectangular, triangle, sine, noise, and direct current). Three parallel samples were set for each group and then subjected to ES for 30 minutes per day for 4 days. Cell proliferation was detected by thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT) assay. **Results** When ES parameters were fixed at frequency of 100.0 Hz, duty of cycle 50% and waveform of rectangular, ES amplitude more than 500 mV/cm inhibited RSC96 proliferation. When ES parameters were fixed at frequency of 100.0 Hz, duty cycle of 50%, and amplitude of 500 mV/cm, ES waveform of positive pulse, rectangular, triangle and sine all promoted RSC96 proliferation. When ES parameters were fixed at amplitude of 500 mV/cm, duty cycle of 50% and waveform of rectangular, ES at frequency 100.0 - 1 000.0 Hz significantly promoted RSC96 proliferation. When ES parameters were fixed at frequency of 100.0 Hz, waveform of rectangular and amplitude of 500 mV/cm, duty cycle of different percentage had no obvious impact on RSC96 proliferation. **Conclusion** It is demonstrated that ES parameters play an important role in its impact on proliferation of RSC96. ES with amplitude ≤ 500 mV/cm, frequency of 100.0 - 1 000.0 Hz and regular pulse waveform obviously promote cell proliferation. This optimal ES parameters has potential application prospect in peripheral nerve regeneration.

Key words: electrical stimulation; Schwann cell; cell proliferation; peripheral nerve

作者单位:1.中国科学院 长春应用化学研究所,吉林 长春 130022;2.中国科学院大学,北京 100039;3.吉林大学 附属第二医院 脊柱外科,吉林 长春 130041;4.清华大学 化学系,北京 100084

作者简介:王宇(1979-),男,吉林长春市人,博士研究生,主要从事再生医学研究。E-mail:wydna@ciac.ac.cn.

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(51203152)

通讯作者:章培标(1967-),男,浙江丽水人,博士,研究员,主要从事生物医用材料的研究。电话:0431-85262058。E-mail:zhangpb@ciac.ac.cn.
危岩(1957-),男,江西临川人,博士,教授,主要从事高分子材料合成、表征及性质研究。电话:010-62772674。E-mail:weiyen@tsinghua.edu.cn.

版权©保护,不得翻录。

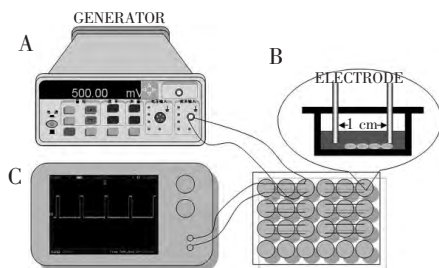
在过去的几十年中,电刺激已经大量地被应用于创伤、骨和神经修复等领域^[1-3]。细胞因子、人工基质材料、药物、物理刺激、生物反应器等技术的应用大大提高了组织工程产品的结构和功能^[4]。在这些技术手段中,电刺激是一个非常有潜力的调控因素。由于电刺激能够有效地调控细胞的增殖、分化、定向生长、迁移,因此它在组织工程修复过程中具有十分重要的意义^[5,6]。在目前的多项研究中使用的电信号参数各有不同,电刺激信号的条件差异较大^[7-9]。这不利于电刺激在临床治疗中的应用。笔者以大鼠雪旺细胞(RSC96)作为模型,研究了电刺激信号不同的电压、波形、频率和脉冲占空比对细胞增殖的影响,寻找一个有利于 RSC96 增殖和生长的最适合的电刺激参数范围。雪旺细胞是一种周围神经系统中的神经胶质细胞,它包裹在神经纤维的外围,能分泌神经营养因子,促进损伤的神经元修复和再生,它是周围神经系统中神经纤维的组成部分,在外周神经修复过程中起着关键的作用^[10,11]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 体外电刺激装置

电刺激装置是由笔者实验组自己制作而成。细胞体外电刺激培养装置由 24 孔细胞培养板(美国 Corning)改装而成,铂电极被固定于培养板的盖子上,铂电极的距离是 1 cm。不同参数的电刺激信号由数字函数信号发生器(汉泰 HDG2002B)产生,数字函数信号发生器产生的电刺激信号通过导线施加在培养板内生长的细胞。整个电刺激信号输出的稳定性由数字型示波器(优利德 UTD2102XL)进行监视(图 1)。



A: 数字函数信号发生器; B: 含电极细胞培养板; C: 数字示波器。

图 1 体外细胞电刺激培养系统

Fig. 1 Cells electrical stimulation culture system *in vitro*

1.1.2 实验细胞与主要试剂

RSC96 细胞系购买自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

10%胎牛血清(四季青,中国);达氏修正依氏培

养液(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)(Invitrogen, 美国);四甲基偶氮唑盐(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)(Sigma, 美国);磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)(索莱宝, 中国);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组

将 RSC96 放于含有 10%胎牛血清的高糖 DMEM 中,于 37℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度下培养,每隔 1 d 更换 1 次培养液,当细胞密度达到 80%,传代培养。经过 2 次传代培养的 RSC96 以 1.25 × 10⁴ /孔的密度种植于 24 孔细胞培养板中。

实验分为电刺激组和对照组。电刺激组施加不同的电刺激信号,对照组与电刺激组平行培养不施加任何电刺激。

1.2.2 电刺激方法

细胞 2 次传代后次日分别采用不同电压(10、100、500、1 000、5 000、10 000 mV/cm)、不同频率(0.1、1.0、100.0、1 000.0、10 000.0、1 000 000.0 Hz)、不同脉冲占空比(5%、10%、30%、50%、70%、90%),以及不同波形(正脉冲波、矩形波、三角波、正弦波、杂波、直流波)对细胞进行电刺激,每组设置 3 个平行样,每天刺激 30 min,持续刺激 4 d。

1.2.3 细胞增殖率检测

RSC96 在不同电刺激信号条件下刺激 4 d 后,分别对每组细胞进行细胞增殖率检测。细胞增殖检测采用 MTT 法。每个细胞样品中加入质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 储液(5 mg/mL),37℃下继续培养 4 h。去除培养板中的培养液,用 PBS 洗 3 次,每次洗 5 min。加入 DMSO,用酶标仪检测 492 nm 的光密度,计算细胞增殖率。未加电刺激作用的细胞作为阴性对照组。细胞增殖率(%) = OD₄₉₂(待测样品) × 100% / OD₄₉₂(阴性对照)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 版本软件进行统计分析。计量资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同电压刺激对细胞增殖的影响结果

当固定电刺激频率 100.0 Hz、脉冲占空比 50%、波形为矩形波时,对 RSC96 施加不同强度电压刺激 4 d 后,分析 RSC96 细胞增殖率。当电压 > 500 mV/cm 时,细胞的增殖显著受到抑制。当电压 ≤ 500 mV/cm 时,细胞增殖率维持在 90%以上,对细胞的增殖无显

著抑制作用。因此体外 RSC96 电刺激实验中,细胞能承受的最大电压是 500 mV/cm(图 2)。

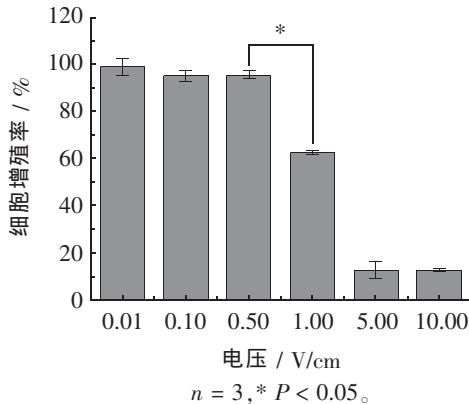


图 2 不同电压的电刺激信号对 RSC96 增殖的影响

Fig. 2 Effect of different electrical stimulation amplitude on RSC96 proliferation

2.2 不同波形刺激对细胞增殖的影响结果

当固定电刺激频率 100.0 Hz、脉冲占空比 50 %、电压 500 mV/cm 时,对 RSC96 施加不同波形的电刺激信号作用 4 d 后,分析 RSC96 增殖率。正脉冲波的细胞增殖率为 112.3 %,正弦波为 104.4 %,矩形波为 103.6 %,三角波 101.5 %,对细胞增殖有促进作用,而杂波(97.3 %)和直流波(98.2 %)对 RSC96 增殖有微弱的抑制作用(图 3)。

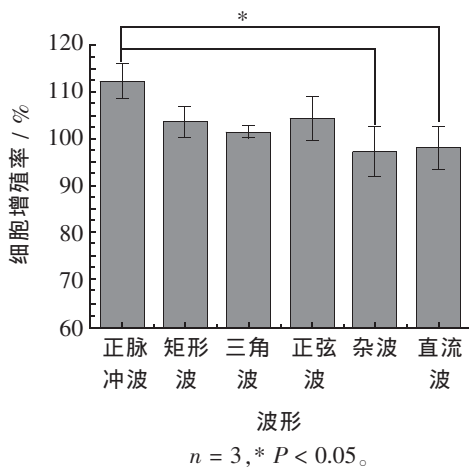


图 3 不同电刺激波形对 RSC96 增殖的影响

Fig. 3 Effect of different electrical stimulation waveform on RSC96 proliferation

2.3 不同频率刺激对细胞增殖的影响结果

当固定电刺激波形为矩形波、脉冲占空比 50 %、电压 500 mV/cm 时,RSC96 经过不同电刺激频率作用 4 d 后,分析细胞增殖结果。频率为 1 000.0 Hz 组细胞增殖率最高为 102.3 %,其次为 100.0 Hz 组 96.4 %。0.1、1.0、10 000.0、1 000 000.0 Hz 组细胞增殖率差别不大,维持在 85.0 % ~ 90.0 %。1 000.0 Hz 组细胞增

殖率略高于阴性对照组,对 RSC96 增殖有一定的促进作用(图 4)。

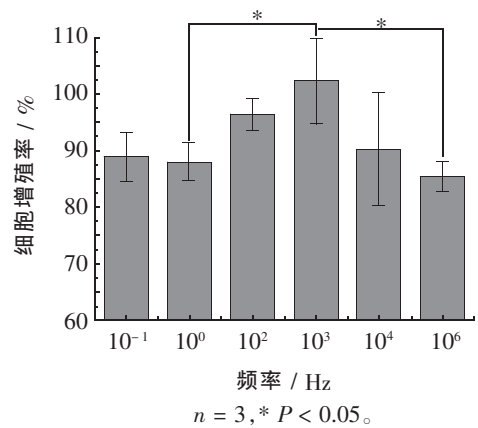


图 4 不同频率电刺激信号对 RSC96 增殖的影响

Fig. 4 Effect of different electrical stimulation frequency on RSC96 proliferation

2.4 不同脉冲占空比刺激对细胞增殖的影响结果

当对 RSC96 施加不同脉冲占空比信号刺激 4 d 后,从结果可以看出,脉冲占空比从 5 % ~ 90 %,相对应的细胞增殖率基本维持在 94.0 % ~ 99.0 %,5 % 和 10 % 组细胞增殖率分别为 98.5 % 和 98.2 %,略高于其他组。细胞增殖的实验结果说明脉冲信号占空比对 RSC96 增殖的影响不明显(图 5)。

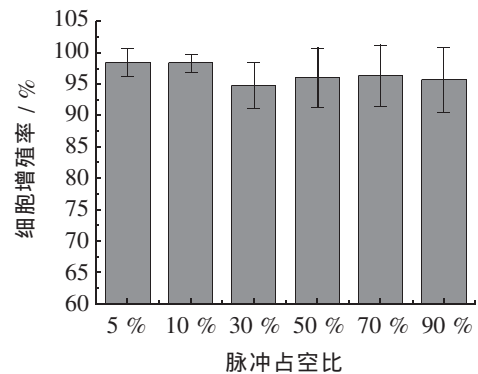


图 5 不同脉冲占空比电刺激信号对 RSC96 增殖的影响

Fig. 5 Effect of different electrical stimulation duty cycle on RSC96 proliferation

3 讨论

外周神经系统是神经系统的重要组成部分,它建立了中枢神经系统和身体各器官的联络。各种意外事故和疾病导致的外周神经的开放性创伤和非开放性创伤均能导致人体部分机能的完全丧失和部分丧失,对患者的生活质量造成很大的影响^[12]。目前在临床上,可通过外科手术、口服药物、康复治疗、物理疗法等手段进行神经损伤修复和重建治疗。非侵入性物理疗法也已经广泛地应用于外周神经损伤的康复

治疗中。在人体内,神经细胞生存在复杂的微电流环境中,神经细胞的活动都伴随有电信号的传递。大量的研究已经证明电刺激能够促进神经损伤的再生和重建。适宜的电刺激对于雪旺细胞的生物学行为的调控作用是电刺激修复外周神经的主要途径之一。雪旺细胞的大量增殖,能够分泌更多的神经生长因子,有利于外周神经的修复^[13]。为了进一步探究电刺激信号在外周神经损伤修复中的作用,笔者使用不同电刺激信号对 RSC96 进行刺激,研究电压、波形、频率、脉冲占空比对 RSC96 增殖的影响,寻找最有利于 RSC96 增殖的电刺激信号。

电刺激信号的变量很多,笔者主要研究了具有代表性的电刺激信号参数,这些参数包括电压、波形、频率和脉冲占空比。首先研究了电压对 RSC96 的增殖影响,细胞作为一个独立的单元对外源的电压承载能力是有限的。当使用适当范围内的电压,有利于细胞的增殖和生长。当电压超过细胞的承载能力后,细胞的增殖会受到抑制甚至凋亡。笔者研究结果证明,当电压 > 500 mV/cm 时,RSC96 的增殖会明显受到抑制。因此,RSC96 电压的最大承载能力是 500 mV/cm。基于以上的结果,在接下来的实验中,所使用的电压均 < 500 mV/cm。不同波形的电刺激实验结果说明,RSC96 的增殖更倾向于有序的脉冲电刺激信号,正弦波、矩形波、三角波、正弦波均能够促进 RSC96 细胞的增殖。而无序的杂波和恒定的直流波电刺激对细胞的增殖有略微的抑制作用。电刺激频率对 RSC96 的增殖有一定的作用,当频率为 1 000.0 Hz 时,能够促进 RSC96 的增殖。因此,频率在 RSC96 增殖中起着关键的作用。脉冲占空比是指脉冲信号的通电时间与通电周期之比。脉冲占空比越高,每个周期中通电的时间就越长。RSC96 增殖实验结果说明脉冲占空比对于细胞的增殖影响有限,不是一个重要的指标。

综上所述,通过笔者的实验结果说明,电压 < 500 mV/cm、有序重复的脉冲波形、100.0 ~ 1 000.0 Hz 频率的电刺激信号对于 RSC96 的增殖有显著的促进作用。这个优化的电刺激条件可以应用于临床的外周神经损伤的电刺激物理疗法,也可以根据此参数设计开发与外周神经损伤修复相关的理疗设备。

参考文献:

[1] Meyer V, G6rge T. Electrical stimulation to accelerate wound healing in Wegener's disease[J]. Journal Der Deutschen Der-

matologischen Gesellschaft, 2011, 9(Suppl s1): 250-250.

- [2] de Haas WG, Watson J, Morrison DM. Non-invasive treatment of ununited fractures of the tibia using electrical-stimulation[J]. J Bone Joint Surg Br, 1980, 62-B(4): 465-470.
- [3] Rossini PM, Burke D, Chen R, et al. Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: Basic principles and procedures for routine clinical and research application. An updated report from an IFCN Committee[J]. Clin Neurophysiol, 2015, 126(6): 1071-1107.
- [4] Balint R, Cassidy N, Cartmell SH. Electrical stimulation: a novel tool for tissue engineering[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2013, 19(1): 48-57.
- [5] Sun S, Titushkin I, Cho M. Regulation of mesenchymal stem cell adhesion and orientation in 3D collagen scaffold by electrical stimulus[J]. Bioelectrochemistry, 2006, 69(2): 133-141.
- [6] Radisic M, Park H, Shing H, et al. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(52): 18129-18134.
- [7] Tsai MT, Li WJ, Tuan RS, et al. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation[J]. J Orthop Res, 2009, 27(9): 1169-1174.
- [8] Hronik-Tupaj M, Rice WL, Cronin-Golomb M, et al. Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields [J]. Biomed Eng Online, 2011, 10: 9-9.
- [9] Sun LY, Hsieh DK, Yu TC, et al. Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Bioelectromagnetics, 2009, 30(4): 251-260.
- [10] Wang L, Sanford MT, Xin ZC, et al. Role of Schwann cells in the regeneration of penile and peripheral nerves[J]. Asian J Androl, 2015, 17(5): 776-782.
- [11] Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC. Schwann cells: development and role in nerve repair[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(7): 15-15.
- [12] Guth L. Regeneration in the mammalian peripheral nervous system[J]. Physiol Rev, 1956, 36(4): 441-478.
- [13] TANG Jia, XIE Song-lin. The research progress of peripheral nerve injury repair methods[J]. Lingnan Modern Clinics in Surgery, 2015, 15(6): 751-754. [汤佳, 谢松林. 周围神经损伤修复方法的研究进展[J]. 岭南现代临床外科, 2015, 15(6): 751-754.]

(收稿日期:2016-03-11;修回日期:2016-05-19)