

## 电刺激对背根神经节和雪旺细胞髓鞘化的影响

雷涛<sup>1</sup>, 刘玉红<sup>2</sup>, 张煜<sup>3</sup>, 梁卓文<sup>4</sup>

1. 空军军医大学生物医学工程系, 陕西 西安 710032; 2. 空军军医大学口腔医院口腔科, 陕西 西安 710032; 3. 联勤保障部队解放军第901医院, 安徽 合肥 230031; 4. 空军军医大学西京医院, 陕西 西安 710032

**【摘要】目的:**建立体外的背根神经节(DRG)—雪旺细胞(SCs)—电刺激模型,为研究电刺激促周围神经成髓鞘机制提供基础。**方法:**以函数发生器和电刺激小室构建电刺激细胞培养系统,DRG/SCs共培养24 h后分为对照(Ctrl)组和电刺激(ES)组。ES组给予矩形波电刺激,6 Vp-p, 10 Hz, 1 h/d, 7 d。Ctrl组无电刺激。利用CCK8观测电刺激对细胞毒性的影响,利用髓磷脂碱性蛋白(MBP)免疫荧光检测电刺激对DRG/SCs髓鞘化的影响。**结果:**CCK8细胞增殖毒性实验显示,ES组光密度值略高于Ctrl组,但两组之间无统计学意义。免疫荧光检测结果显示ES组MBP的荧光强度明显高于Ctrl组( $P<0.01$ )。**结论:**本文设计的电刺激细胞培养系统对神经细胞安全无毒,连续7 d的电刺激可提高神经髓鞘化率。

**【关键词】**电刺激;导电玻璃;背根神经节;雪旺细胞;髓鞘化

**【中图分类号】**R318

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2021)10-1285-04

## Effects of electrical stimulation on the myelination of dorsal root ganglia and Schwann cells

LEI Tao<sup>1</sup>, LIU Yuhong<sup>2</sup>, ZHANG Yu<sup>3</sup>, LIANG Zhuowen<sup>4</sup>

1. Department of Biomedical Engineering, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Stomatology, Stomatological Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 3. The 901st Hospital of People's Liberation Army Joint Logistic Support Force, Hefei 230031, China; 4. Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

**Abstract: Objective** To establish an *in vitro* dorsal root ganglion (DRG)-Schwann cells (SCs)-electrical stimulation (ES) model for providing a basis for the investigation on the mechanism of ES in promoting peripheral nerve myelination. **Methods** A function generator and an ES chamber were used to construct an ES cell culture system. After being co-cultured for 24 h, DRG/SCs were divided into control group and ES group. The ES group was given rectangular wave ES, 6 Vp-p, 10 Hz, 1 h/d, for 7 days; and no ES was applied in control group. The effect of ES on cytotoxicity was observed using CCK8, and the effect of ES on the myelination of DRG/SCs was detected by immunofluorescence using myelin basic protein. **Results** The CCK8 cell proliferation and toxicity assay showed that the optical density of ES group was slightly higher than that of control group, but there was no statistical significance between two groups. The immunofluorescence assay revealed that the fluorescence intensity of myelin basic protein in ES group was significantly higher than that in control group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The ES cell culture system designed in the study is safe and non-toxic to neuronal cells, and ES for 7 days in succession can increase the rate of neural myelination.

**Keywords:** electrical stimulation; conductive glass; dorsal root ganglia; Schwann cell; myelination

### 前言

促周围神经系统的髓鞘化在周围神经损伤的修复中扮演着重要作用,而周围神经系统的髓鞘化过

程是由多因素调节的髓鞘形成细胞-雪旺细胞(SCs)与轴突之间复杂的相互作用过程<sup>[1-3]</sup>。在腕管综合征引起的正中神经损伤患者术后给予电刺激治疗,证实短暂低频的电刺激治疗可显著促进神经再生,刺激神经支配区域的感觉和运动功能,但具体机制不清楚<sup>[4-5]</sup>。因此,建立体外的背根神经节(DRG)-SCs-电刺激模型可为研究电刺激促周围神经成髓鞘机制提供基础。

本文设计了一种电刺激细胞培养系统,该系统具备组装简单、高透明性、可滑动拆卸玻片的特点,

**【收稿日期】**2021-05-15

**【基金项目】**国家自然科学基金(51907197)

**【作者简介】**雷涛,博士,讲师,研究方向:电磁场生物效应, E-mail: tsyj0hi@126.com

**【通信作者】**梁卓文,博士,主治医师,研究方向:神经损伤的修复, E-mail: 282204737@qq.com

可用于各种成像设备的观察,无须转移和破坏细胞。该系统可用于DRG-SCs-电刺激模型。

# 1 材料和方法

## 1.1 电刺激细胞培养系统的设计

电刺激细胞培养系统包括函数发生器(安捷伦科技公司)和电刺激小室(自制)(图 1a)。函数发生器产生波幅为 6 V<sub>p-p</sub>、频率为 10 Hz 矩形波(图 1b)。电刺激小室从上到下共由 5 个部分组成:聚苯乙烯盖(Biologix, 中国)、中空聚苯乙烯室

(Biologix, 中国)、生物相容性垫片(Biologix, 中国)、导电玻璃(58 mm×25 mm×1 mm, 顾洛公司, 中国)和聚苯乙烯夹具(Biologix, 中国)(图 1a)。中空聚苯乙烯室被生物相容性垫圈包围,导电玻璃在中空聚苯乙烯室的下方。聚苯乙烯夹具固定中空聚苯乙烯室和导电玻璃,防止培养基外流。电刺激小室可根据实验设计进行串联或并联电路。在本研究中,将3个电刺激小室用铜线和导电夹并联,用于多个样本的电刺激干预(图2)。

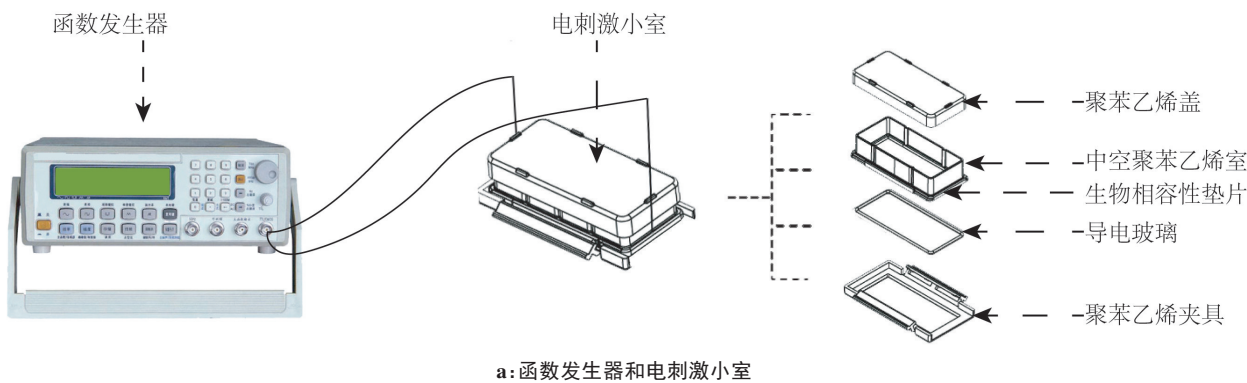


Fig.1 Electrical stimulation (ES) cell culture system

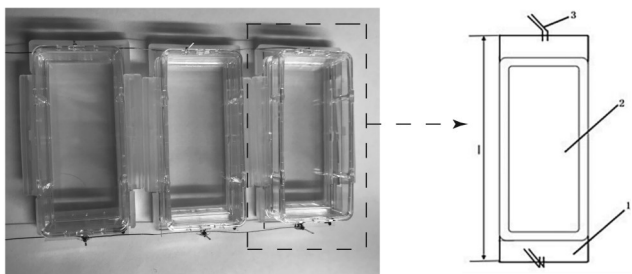


图 2 电刺激小室

Fig.2 ES chamber

3个小室用导电夹和铜线并联进行多个样本干预;小室主要包括:导电玻璃(1)、细胞培养中空聚苯乙烯室(2)及导电夹(3)

## 1.2 细胞培养

**1.2.1 DRG 培养** 从新生 1 天 SD 大鼠收集 DRG, 剪碎后加入 0.5 mL 胶原酶、1 mL 0.25% 胰蛋白酶(不含乙二胺四乙酸)及 1 mL DME/F12(HyClone, USA)消化 1 h, 用 40 μm 微孔过滤器过滤后终止消化。以 500 g/min 的转速离心 5 min。将细胞悬浮在含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DME/F12 培养基(Gibco, USA)中,然后将细胞悬液

以 3×10<sup>5</sup> 个细胞的密度接种在电刺激小室的导电玻璃上。培养 24 h 后,更换培养基,用 Neurobasal(Gibco, USA)+B27(Gibco, USA)+NGF(50 ng/mL)(R&D Systems, USA)+5-FU(31 μmol/mL)(HSRVEY, USA)培养 48 h,去除非 DRG 细胞,在不含 5-FU 的培养基中继续培养 3 d,以备实验使用<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 SCs 培养** 从新生 1 天的 SD 大鼠收集双侧坐骨神经,剪碎后置入 5 mL 离心管中,随后加入 1 mL 胶原酶、1 mL 0.25% 胰蛋白酶(不含 EDTA)和 1 mL DME/F12 进行消化。消化 30 min,以 500 g/min 的转速离心 5 min。将细胞悬浮在含 10% FBS 血清的 DME/F12 培养基中,37 °C 培养 24 h,然后用含 5-FU(31 μmol/mL)、Forskolin(10 μmol/mL)和 10% FBS 血清的 DME/F12 培养液纯化 48 h,再改为含 Forskolin(10 μmol/mL)和 10% FBS 血清的 DME/F12 培养液培养 48 h,以备实验用<sup>[6]</sup>。

**1.2.3 DRG/SCs 共培养** 将 SCs 用 0.25% 的胰蛋白酶(含 EDTA),消化 5 min,500 g/min 的转速离心 5 min

后使用含10% FBS血清的DME/F12培养液重悬,吸除导电玻璃培养板的培养液,将SCs以 $2 \times 10^5$ 的密度接种于培养DRG的电刺激小室中培养24 h。之后更换为Neurobasal+B27+NGF(50 ng/mL)+5% FBS培养液培养。

### 1.3 电刺激方案

电刺激小室在使用前经超声波清洗、洗涤、干燥,然后进行紫外线照射消毒(12 h)。消毒后,用多聚赖氨酸包被导电玻璃表面3 h。DRG/SCs共培养24 h后分为对照(Ctrl)组和电刺激(ES)组。ES组给予矩形波电刺激,波幅6 Vp-p,频率10 Hz,1 h/d,7 d。Ctrl组无电刺激。Ctrl组和ES组的培养基每2 d更换1次。在整个过程中,电极与培养基和细胞不接触,导电玻璃的导电性能正常。

### 1.4 细胞毒性检测

检测导电玻璃培养系统是否对细胞产生毒性,DRG/SCs共培养7 d时,ES组和Ctrl组细胞样品分别转移至96孔板,在37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱培养24 h,再向每孔加入10 μL Cell Counting Kit-8(CCK8)溶液,继续培育1 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。

### 1.5 免疫荧光检测

DRG/SCs细胞的髓鞘形成由髓磷脂碱性蛋白(MBP)的免疫荧光标示,神经网络以神经微丝蛋白200(NF200)标示。在第7天,将DRG/SCs细胞在室温下用4%多聚甲醛固定30 min。抗MBP一抗(BIOSS, 中国)和抗NF200一抗(Abcam, 英国)在4℃孵育过夜,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次。避光加入羊抗鼠IgG-488(1:600)二抗、羊抗兔IgG-Cy3(1:600)二抗。用PBS洗涤3次后,在莱卡倒置荧光显微镜成像系统下观察细胞。随机选择5个视野。用ImageJ软件分析荧光强度和面积。荧光密度由荧光强度除以面积得到。

### 1.6 统计学分析

结果以均值±标准误表示, $P < 0.05$ 认为结果有统计学差异。数据用SPSS 20.0.0统计软件进行分析。每个实验至少重复3次。组间比较采用独立样本 $t$ 检验分析。

## 2 结果

CCK8细胞毒性结果显示(图3),ES组的光密度(OD)值略高于Ctrl组,但两组之间无统计学意义( $P > 0.05$ )。因此,证实导电玻璃培养体系对神经细胞无毒性。

半定量结果显示ES组MBP荧光强度明显高于Ctrl组( $P < 0.01$ )(图4)。图5为Ctrl组和ES组DRG/SCs细胞的MBP蛋白免疫荧光。神经网络以NF200染色表示(绿色),髓鞘段以MBP染色表示(红色)。

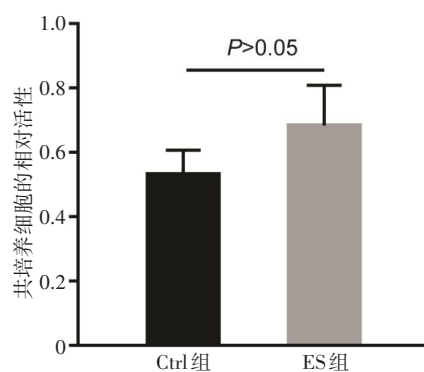


图3 7天的电刺激对DRG/SCs细胞毒性的影响

Fig.3 Effects of 7-day ES on the cytotoxicity of DRG/SCs

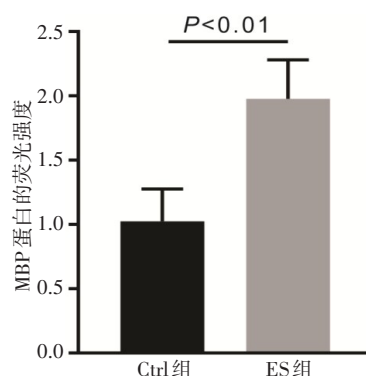


图4 Ctrl组和ES组MBP荧光强度的半定量结果

Fig.4 Semi-quantitative results of fluorescence

intensity of MBP in control group and ES group

## 3 讨论

实验结果表明,本文设计的电刺激细胞培养系统对神经细胞安全无毒,连续7 d的电刺激可提高神经髓鞘化率。

周围神经损伤的自愈能力有限,导致肌肉组织相应萎缩,功能丧失<sup>[7-8]</sup>。电刺激可以直接促进轴突生长,提高神经修复的速度和成功率<sup>[9-10]</sup>。同时,电刺激可以增加SCs的活性和神经营养因子的分泌,但具体的分子机制尚不清楚<sup>[11-14]</sup>。建立一个简单、有效、可重复的电刺激细胞培养系统,对于研究神经细胞与电流的相互作用机制,制定有效的临床电刺激治疗参数尤为重要。与以往报道的电刺激设备相比<sup>[15-17]</sup>,本研究中的电刺激培养系统组装简单,电极不与培养液和细胞接触,不会产生毒性。另外,该系统电流均匀,高清晰度的导电玻璃可以满足各种检测成像要求。此外,通过使用串联或并联的电刺激室,可以满足不同种类的实验需求。

## 4 结论

综上所述,本文设计的电刺激培养系统组装方便,操作简单,价格低廉,可用于各种不同的实验应



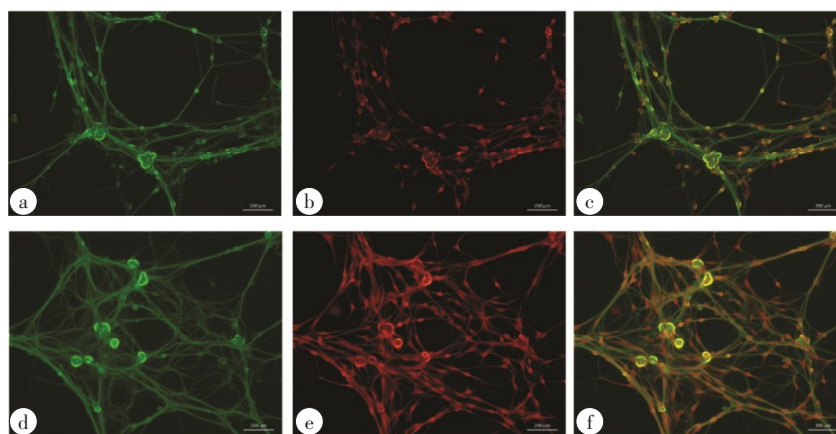


图5 Ctrl组和ES组DRG/SCs细胞的MBP免疫荧光

Fig.5 Immunofluorescence of MBP in DRG/SCs in control groups and ES groups

a: 对照组, 神经网络经NF200染色(绿色); b: 对照组, 髓鞘段(红色)经MBP染色; c: 对照组, MBP蛋白在共培养7 d后的轴突上表达; d: ES组, 神经网络经NF200染色(绿色); e: ES组, 髓鞘段(红色)经MBP染色; f: ES组, MBP蛋白在共培养7 d后的轴突上表达显著

用。该系统对神经细胞共培养成髓鞘有明显的刺激作用, 为研究神经与电信号的关系提供了良好的实验平台。

## 【参考文献】

- [1] 陈菁, 王燕, 曾琳, 等. 基于雪旺细胞-背根节神经元共培养建立周围神经髓鞘化体外模型[J]. 神经解剖学杂志, 2010, 26(1): 9-14.  
CHEN J, WANG Y, ZENG L, et al. An *in vitro* myelination model for peripheral nervous system developed in the Schwann cell -dorsal root ganglion neuron cocultures[J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2010, 26(1): 9-14.
- [2] 李军. 周围神经损伤后雪旺细胞与轴突再生关系的实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2008.  
LI J. Experimental study of relationship between schwann cells and axon regeneration after peripheral nerve injuries[D]. Changchun: Jilin University, 2008.
- [3] 张斌清. AKBA诱导雪旺细胞ERK信号促进周围神经损伤修复的机制研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.  
ZHANG B Q. Mechanism of AKBA-induced ERK Signaling pathway and schwann cell repair peripheral nerve injury[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018.
- [4] GORDON T, AMIRJANI N, EDWARDS D C, et al. Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients[J]. Exp Neurol, 2010, 223(1): 192-202.
- [5] GORDON T. Electrical stimulation to enhance axon regeneration after peripheral nerve injuries in animal models and humans[J]. Neurotherapeutics, 2016, 13(2): 295-310.
- [6] MAUREL P. Preparation of neonatal rat schwann cells and embryonic dorsal root ganglia neurons for *in vitro* myelination studies[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1739: 17-37.
- [7] 李越, 冯华, 李兵仓. 周围神经损伤的外科学处理[J]. 创伤外科杂志, 2020, 22(11): 864-869.  
LI Y, FENG H, LI B C. Surgical management of peripheral nerve injury[J]. Journal of Traumatic Surgery, 2020, 22(11): 864-869.
- [8] 陈焱, 肖志宏, 邢丹谋. 周围神经损伤再生与修复的研究进展[J]. 中华显微外科杂志, 2015, 38(4): 413-416.  
CHEN Y, XIAO Z H, XING D M. Research advances in regeneration and repair of peripheral nerve injury[J]. Chinese Journal of Microsurgery, 2015, 38(4): 413-416.
- [9] EGOROV A V, DRAGUHN A. Development of coherent neuronal activity patterns in mammalian cortical networks: common principles and local heterogeneity[J]. Mech Dev, 2013, 130(6-8): 412-423.
- [10] 赵华, 陈允震, 刘海春, 等. 电刺激对大鼠脊髓损伤后自体骨髓间充质干细胞移植的影响[J]. 中华创伤杂志, 2012, 28(2): 165-169.  
ZHAO H, CHEN Y Z, LIU H C, et al. Effects of spike wave electric stimulation on the transplantation of autogenous marrow mesenchymal stem cells in rats with spinal cord injury[J]. Chinese Journal of Trauma, 2012, 28(2): 165-169.
- [11] WILLAND M P, NGUYEN M A, BORSCHER G H, et al. Electrical stimulation to promote peripheral nerve regeneration[J]. Neurorehab Neural Res, 2016, 30(5): 490-496.
- [12] GORDON T. Nerve regeneration in the peripheral and central nervous systems[J]. J Physiol, 2016, 594(13): 3517-3520.
- [13] ALRASHDAN M S, SUNG M A, KWON Y K, et al. Effects of combining electrical stimulation with BDNF gene transfer on the regeneration of crushed rat sciatic nerve[J]. Acta Neurochir, 2011, 153(10): 2021-2029.
- [14] KOPPEL A N, SEGGO A M, THOMPSON D M. Neurite outgrowth is significantly increased by the simultaneous presentation of Schwann cells and moderate exogenous electric fields[J]. J Neural Eng, 2011, 8(4): 46023.
- [15] DAUBEN T J, ZIEBART J, BENDER T, et al. A Novel *in vitro* system for comparative analyses of bone cells and bacteria under electrical stimulation[J]. Biomed Res Int, 2016: 5178640.
- [16] MOBINI S, LEPIK L, BARKER J H. Direct current electrical stimulation chamber for treating cells *in vitro*[J]. Biotechniques. 2016, 60(2): 95-98.
- [17] LEE H U, BLASIAK A, AGRAWAL D R, et al. Subcellular electrical stimulation of neurons enhances the myelination of axons by oligodendrocytes[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e179642.

(编辑: 薛泽玲)