

电刺激联合干细胞修复周围神经损伤的研究进展*

赵鹏程^{1, 2)} 吕永钢^{1, 2)**} 邹 杨^{1, 2)} 张小梅^{1, 2)} 陈国宝^{1, 2)} 杨 力^{1, 2)}

(¹⁾ “生物流变科学与技术”教育部重点实验室(重庆大学), 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044;

²⁾ 重庆大学生物工程学院国家“111计划”基地, 重庆 400044)

摘要 周围神经损伤在创伤中较为常见, 易造成神经系统部分或全部损伤, 从而导致功能丧失和其他神经性疾病。尽管周围神经损伤的治疗效果随着科技的发展有了明显提高, 但距离真正的形态和功能重建还相差甚远, 神经再生及功能恢复速度缓慢仍是临床治疗的难点。电刺激因使用方便、无创和副作用小等优点越来越受到研究者的青睐, 与干细胞联合广泛用于周围神经损伤修复的体外研究。本文论述了电刺激联合干细胞在周围神经损伤修复方面的研究进展, 并讨论了其可能的作用机理。特别分析了电刺激联合干细胞在周围神经损伤修复研究中的难点, 展望了其发展前景。

关键词 周围神经, 干细胞, 电刺激, 修复, 生物反应器

学科分类号 Q68, R319

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00467

周围神经通过神经元将信息沿着感觉和运动纤维传递, 使中枢神经系统(central nervous system, CNS)与周围器官相互联系。周围神经损伤常见于各种外伤(如压迫、牵伸、撕裂、切断)以及其他条件(如局部缺血、肿瘤), 造成神经系统部分或全部损伤, 从而导致功能丧失和其他神经性疾病^[1-2]。有报道表明 2.8% 的创伤患者受到周围神经损伤的影响, 部分患者甚至会因此而终身残疾^[3-4]。美国 and 欧洲每年都有几十万人受到周围神经损伤疾病的影响^[5-6]。我国目前仅伴有神经损伤的四肢创伤病患者就达 30 万人/年, 加上因其他医源性和肿瘤切除等引起的神经损伤患者, 每年需要进行神经修复的伤病患者人数将更多^[7], 所需护理和治疗的经济费用也高得惊人。尽管周围神经损伤的治疗效果随着科技的发展有了明显提高, 但距离真正的形态和功能重建还相差甚远^[2]。神经再生及功能恢复速度缓慢, 由此造成的支配靶器官萎缩、变性、功能障碍是临床治疗的难点^[8]。探索提高周围神经修复速度的有效方法有助于进一步提高周围神经形态和功能重建的质量, 对理论研究和临床治疗均具有重要的意义。

Seddon^[9]将周围神经损伤分为神经失用症(neurapraxia)、轴索断裂(axonotmesis)和神经断伤

(neurotmesis)三种类型, Sunderland^[10]在此基础上进一步将周围神经损伤细分为 5 度。与中枢神经系统不同, 周围神经系统具有内在的再生能力, 恢复效果依赖于其损伤的程度。当神经断裂后, 神经内膜管的损坏导致神经功能不易恢复, 伤口处结缔组织形成的疤痕结构阻碍轴突再生并导致近端神经枝形成神经瘤, 而远端神经的长期去神经化易致使神经内膜管、神经干以及目标器官萎缩^[4]。加之修复神经断裂型损伤需要外科手术干预, 因而神经断裂被认为是修复过程挑战性较大的神经损伤类型。为了阻止过多结缔组织的侵入, 必须移植他物填充或进行桥连接诱导修复。虽然自体组织(如神经、静脉、动脉、反转静脉、肌肉等)桥接损伤神经的方法使可修复断损神经的间距有所增加, 但是该方法在取材方面受到供体来源的限制, 同时易造成供体

* 新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-10-0879), 国家自然科学基金资助项目(11172338), 重庆市科委科技攻关重大项目(2009AA5045), 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目, 重庆大学大型仪器设备开放基金资助项目和“研究生科技创新基金”中央高校个人项目(CDJXS112300)。

** 通讯联系人。

Tel: 023-65111632, E-mail: yglv@cqu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-12, 接受日期: 2011-12-31

部分的功能丧失, 临床应用时还存在可修复长度受限、可能形成神经瘤等问题^[11]。随后发展起来的异体神经(或组织)移植尚急需解决免疫抑制问题, 至少目前在临床上广泛应用有一定难度。19 世纪末开始, 学者提出利用神经导管重建神经再生微环境以促进神经再生的设想, 目前已被用于制备神经导管的材料可分为非神经组织、非生物降解材料和可生物降解材料等^[12]。然而, 很少有神经导管的性能超过自体神经移植, 在老鼠模型中应用其修复缺口大于约 10 mm 的神经损伤时更少有非常成功的, 主要是因为神经跨过较大间隙的再生能力较弱, 或者神经功能恢复需要的时间过长。周围神经组织工程为解决周围神经修复所面临的难题提供了很有吸引力的解决方法, 它是将组织工程研究的三要素: 种子细胞、支架材料、生长因子相结合, 构建一种理想的周围神经修复材料^[13](图 1^[14])。干细胞由于具有自我更新以及向特定细胞(比如神经元、施旺细胞、神经胶质细胞以及少突胶质细胞)分化的能力而被认为是神经再生组织工程中较好的种子细胞^[15]。神经营养因子、激素、化学物质以及物理因子刺激等也常被用于进一步提高修复效率^[16]。作为物理因子的一种, 电刺激因具有使用方便、无创和副作用小等优点越来越受到研究者的青睐, 已成为临床周围神经修复的辅助治疗方法。电刺激联合干细胞进行周围神经修复, 可通过刺激髓鞘再生、上调神经生长因子表达、增加神经纤维密度^[17-20]、促进干细胞增殖和分化以及增强再生神经和周围液体之间的溶质交换等方式, 提高断裂和夹伤周围神经的再生效率^[21-22](图 1)。单一电刺激对周围神经损伤修复的作用已有了很全面的综述^[16, 23-24], 在此不

再赘述。本文对电刺激联合干细胞在修复周围神经损伤的研究进展和作用机理进行综述。

1 电刺激对干细胞黏附、迁移、增殖和分化的影响

利用电刺激促进周围神经修复的灵感来自生物电, 人体生物电在维持神经系统信号传递、肌肉收缩、伤口愈合等正常生物学功能中起着非常重要的作用^[21, 25]。电刺激在二维或三维离体以及在体中都较易实现^[21, 26]。细胞、动物和临床试验均证实电刺激能有效促进周围神经损伤的修复^[14, 21, 27]。张立宁和王兴林^[23]推测电刺激可能通过: a. 加速损伤远侧神经段的 Wallerian 变性过程; b. 促进轴索再生; c. 改变细胞内分子的分布; d. 改善神经支配器官的功能; e. 打通从脊髓到周围神经的通路; f. 兴奋大脑皮质运动区及脊髓前角细胞; g. 刺激神经生长因子分泌等途径促进周围神经再生。在与干细胞联合进行周围神经损伤修复时, 电刺激除了有上述作用以外, 还会对干细胞黏附^[26]、迁移^[28]、增殖^[21-22, 29]和分化^[22, 30-31]产生作用:

1.1 黏附

细胞的黏附是组织充分发挥功能的重要因素。在组织工程研究中通常将细胞种植在 3D 支架上, 一方面可为细胞黏附提供锚位点(anchorage points), 另一方面还可通过黏附为细胞提供适宜的微环境, 调控细胞的分化、代谢以及细胞间的信号传递, 这在利用干细胞进行周围神经修复中具有重要的作用^[32-33]。研究者已通过施加电刺激^[26]以及采用导电性聚合物材料^[34]调节细胞的黏附功能。

Sun 等^[26]基于电刺激能引起 2D 基质中多种细胞反应, 进一步探究了无创电流对 3D 胶原支架中骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)和纤维母细胞黏附和定向的影响。他们发现, 纤维母细胞经直流电刺激后将伸长并再定位于垂直电流刺激的方向, 但是 MSCs 却表现出对物理变化的耐受性, 维持原来的细胞定向, 仅小部分(不到 10%)MSCs 的形态出现收缩和再定位。此外, 利用多光子显微镜(multiphoton microscopy)技术观察电刺激对胶原支架上细胞黏附能力的影响时, 发现纤维母细胞在胶原上呈纺锤形并且电刺激能使得这一特性更显著。但是与纤维母细胞相比, MSCs 在 3D 胶原支架中表现出不同的黏附特性, 无电流刺激时 MSCs 在胶原纤维上不呈现纺锤形, 与 MSCs 黏附的胶原纤维束随机排列并表现出明显的集中性质,

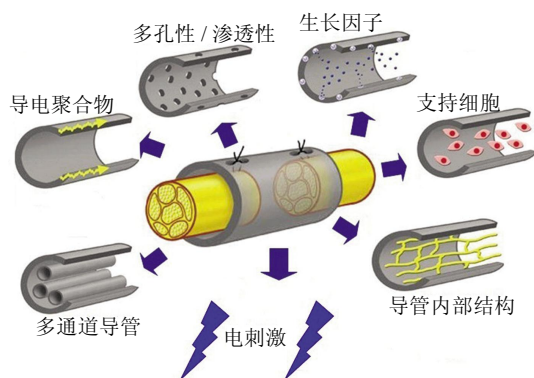


Fig. 1 Electrical stimulation combined with stem cells stimulates nerve regeneration (modified from [14])

图 1 电刺激联合干细胞刺激周围神经修复 (修改自[14])

而且细胞周围的胶原纤维束呈密集定向分布, 这说明 MSCs 与其周围的微环境连接更紧密. 施加电刺激后, MSCs 的再定位和胶原纤维的重新排列并不明显, 只有调整电场刺激到更大强度(10 V/cm)时才能让 MSCs 周围的胶原纤维分离并重排, 这证明电刺激可通过调整电场强度来调节 MSCs 与胶原纤维的黏附. Gabi 等^[35]利用自己设计的类神经芯片(neurochip)也证实电刺激能控制神经元的黏附能力.

Saltó 等^[34]研发了一种聚合物表面开关以控制干细胞的黏附, 即通过切换聚乙撑二氧噻吩: 甲苯磺酸盐聚合物(poly(3, 4-ethylenedioxythiophene)(PEDOT): Tosylate polymer)薄膜电极的氧化状态和还原状态以调控干细胞在聚合物表面的黏附特性. 他们首先将 PEDOT: Tosylate 薄膜分别制成大小相同的正负 2 个电极, 然后使用 1.5 V 的电势差分别作用于这 2 个电极以诱导薄膜出现电化学反应, 持续 20 s, 使得负向电极还原为中性状态, 正向电极变为完全氧化状态, 从而制备出两种分别被还原和被氧化的 PEDOT: Tosylate 薄膜电极. 随后他们将新生老鼠脑外胚层 c17.2 神经干细胞(neural stem cells, NSCs)和中脑腹侧的 NSCs 分别种植在这两种薄膜, 2~4 h 后对细胞进行核染色并计数统计发现 c17.2 NSCs 和中脑腹侧的 NSCs 都青睐于附着在氧化表面. 与被还原的薄膜电极相比, 被氧化的薄膜电极使 c17.2 NSCs 的黏附增加了 2 倍(如图 2a 所示), 说明通过控制聚合物的氧化状态能够调控聚合物的黏附特性.

此外, 他们还进一步探讨了聚合物表面氧化状态/还原状态调控干细胞黏附的分子机制, 以往的研究已经证明, 蛋白质、整合素以及暴露的肌动蛋白一方面可作为细胞黏附在材料表面的锚定分子, 另一方面也能促进邻近细胞间的连接, 同时这些分子与材料的吸附功能又与材料表面的物理和化学特性相关^[36]. 针对这一观点, Saltó 等^[34]用 ¹²⁵I 标记的人血清白蛋白(¹²⁵I-stained human serumalbumin, ¹²⁵I-HSA)研究了 PEDOT: Tosylate 薄膜电极不同氧化状态表面对蛋白质吸附能力的影响, 发现 ¹²⁵I-HAS 与还原态(被还原的)薄膜电极结合得更紧, 此外还发现在切换薄膜电极氧化状态和还原状态时改变了膜上的化学成分, 根据细胞黏附和生长强烈依赖于宿主表面的蛋白质密度以及蛋白质基质朝向的理论^[37], 推测不同氧化状态的 PEDOT: Tosylate 薄膜电极在受到电刺激并发生切换效应时将改变其表面的化学成分, 调控黏附在其表面蛋白质的导向从

而控制干细胞的黏附与密度. 又因为细胞在与宿主表面贴近时常分泌蛋白基质帮助其黏附^[38], 而与还原状态薄膜表面紧密结合的血清白蛋白将阻断干细胞自己分泌的蛋白质在表面的黏附(如图 2b 所示), 这就解释了为什么还原状态薄膜电极表面不利于干细胞的黏附.

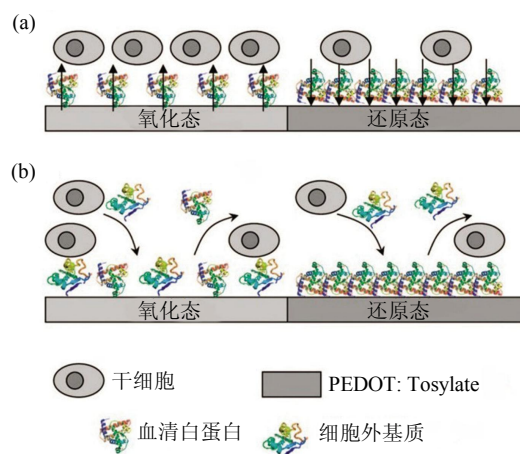


Fig. 2 Proposed mechanisms for the difference in adhesion and density of stem cells achieved between the reduced and oxidized PEDOT: Tosylate electrode surfaces.(modified from [34])

图 2 还原性和氧化性 PEDOT: Tosylate 电极表面上干细胞黏附和密度存在差异的可能机制(修改自[34])

(a) 在氧化状态的 PEDOT 表面形成了一层低密度的血清白蛋白层, 此时血清白蛋白的朝向能够促进干细胞黏附. (b) 靠近宿主表面的干细胞分泌蛋白质形成细胞外基质. 紧密排列的血清白蛋白层阻止细胞沿着电极表面形成细胞外基质.

1.2 迁移

Tandon 等^[39]用直流电场分别对人体脂肪组织源性干细胞(human adipose tissue-derived stem cells, hASCs)、人体心外膜脂肪源性干细胞(human epicardial fat-derived stem cells, heASCs)以及从心脏脂肪中提取出来的 MSCs 进行体外刺激培养, 结果发现, hASCs 与 heASCs 在电场的作用下被拉长, 同时电场还能诱导细胞迁移, 并最终使它们在垂直于电场的方向呈直线排列. 进一步检测还发现, 电场不但可以拆解细胞的间隙连接, 还能促进连接蛋白-43、凝血调节蛋白、血管上皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)基因的表达. Tandon 等^[39]推测细胞可能通过调节与其他细胞之间的间隙连接和细胞密度来转换电场的刺

激, 同时通过使细胞重新排列来缓和电场的效应。此外, 电刺激也能影响 NSCs 的迁移。Arocena 等^[28]利用延时成像(time lapse imaging)技术跟踪 NSCs 的迁移, 测量了电场对 NSCs 迁移的影响。没有电场作用时 NSCs 似变形虫的运动, 移动方向是随机的。施加电场刺激后, 电场会抑制 NSCs 在阳极侧突出的形成, 使其倾向阴极迁移, 同时磷脂酰肌醇 3- 激酶(phosphatidylinositol-3-OH kinase, Pi3K)抑制剂 LY294002 会削弱这一倾向。电场反向后, NSCs 迁移方向会作出相应改变, 他们发现这主要有 2 种模式: a. NSCs 向着原电场阴极的突出收缩, 在向着现电场阴极的一侧形成新的突出; b. NSCs 向着原电场阴极的突出并没被抑制, 只是重新调整到向着新电场阴极一侧。Chang 等^[22]利用自制的一套细胞培养系统, 研究发现双相电流(biphasic electric current, BEC)不但可以明显加强 NSCs 的增殖, 而且还能促进 NSCs 向神经元的分化。神经细胞膜内外存在一定的电势差, 神经突出的生长正是由神经细胞的去极化引起的^[40]。神经突出的伸长是神经细胞迁移的重要现象, 依赖于基底的化学、力学和电特性^[29, 41-42]。通过对生物材料施加电刺激可能会改变细胞外基质蛋白的局部电场, 调节聚合物表面对蛋白质的吸附, 进而促进神经突出的生长^[43](如图 3 所示)^[21]。电刺激干细胞迁移的可能机制也逐步得到研究。最近 Zhao 等^[44]应用延

时成像技术研究了电场刺激下内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的迁移情况, 发现 EPCs 在直流电场中向阴极迁移而且细胞还会被拉长并呈直线排列, 而当用 VEGF 的受体抑制剂抑制 VEGF 受体后, 电场将不能再引起 EPCs 的迁移, 证明电场在体外可通过 VEGF 受体信号通路引导 EPCs 发生迁移。另外, Li 等^[45]也发现, 直流电场可以引导神经干 / 祖细胞(neuronal stem/progenitor cells, NSPCs)向阴极迁移, 迁移到电场阴极的细胞中有 87% 的细胞表达 N- 甲基 -D- 天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptors, NMDARs)的亚基 NR1 和 NR2B, 同时 NMDARs 的抑制剂 DAPV 能明显抑制细胞向电场阴极迁移, 说明电场刺激 NSPCs 迁移需要先激活 NMDARs。进一步研究发现, 电场激活细胞膜上的 NMDARs, 促进 NMDARs、Tiam1(Rac1 的激活物)以及 Pak1(Rac1 的下游靶点)联合形成 NMDAR/Tiam1/Pak1 复合体, 该复合体不但可以激活细胞内部的 Rac1 信号通路并且还能与肌动蛋白细胞骨架(actin cytoskeleton)相互作用。说明电场在刺激神经干 / 祖细胞时, 通过激活膜传感器 NMDAR 将电刺激传递到细胞内并激活 Tiam1/Rac1/Pak1/actin 信号通路从而引起干细胞的迁移。电刺激调控干细胞迁移的机制因干细胞类型差异会不同, 还有待进一步的研究。

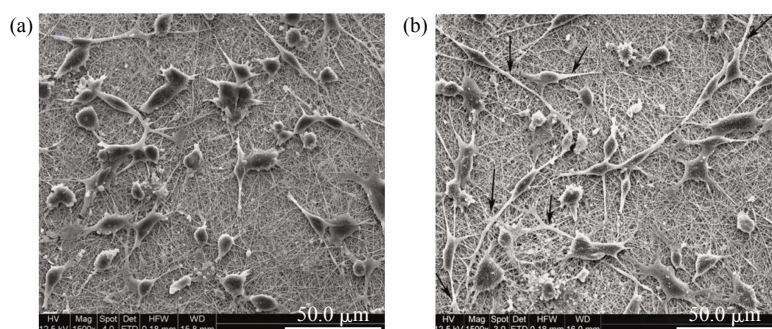


Fig. 3 Morphology of NSCs on polyaniline (PANI)/Poly(ϵ -caprolactone) (PCL)/gelatin nanofibrous scaffolds without electrical stimulation (a) and with electrical stimulation for 1 h (b)^[21]

图 3 神经干细胞在聚苯胺/聚 ϵ -己内酯/明胶纳米纤维支架上在没有电刺激(a)和电刺激 1 h 后(b)的形态^[21]

箭头为神经干细胞伸长的神经突起, 扫描电子显微图像, 1500 $\times$

诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)被认为是胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)的最佳替代者, 在干细胞再生医学领域具有极大的发展潜力, 了解电刺激对 iPSCs 的作

用对再生医学特别是周围神经修复的研究具有重要的意义, 也逐渐得到研究者的关注。Zhang 等^[46]最近发现, iPSCs 在电场中加速向阳极迁移, 同时观察到板状伪足和丝状伪足, 而当改变电场的方向

后, iPSCs 的迁移也同时改变, 它们的迁移方向朝向新的阳极. 另外还发现, 与分散的细胞相比, 细胞集落在电场中的定向性更强, 集落越大细胞朝阳极迁移的一致性就越强, 而且在 3D 环境里电场同样能诱导 iPSCs 迁移. 该研究表明 iPSCs 具有趋电性, 电场对 iPSCs 的迁移具有导向作用, 而且 Rho 激酶(ROCK)的抑制剂 Y27632 会抑制电场对 iPSCs 的这一作用. Zhang 等^[46]进一步比较了 iPSCs 和 ESCs 的趋电性差异, 发现 iPSCs 对电场的敏感性更强, 而且它们在电场中的迁移方向也不同, ESCs 向阴极迁移而 iPSCs 向阳极迁移.

1.3 增殖

Kim 等^[30]发现, 双相电流可以明显加强人 MSCs 向施旺细胞分化的能力, 同时还能促进施旺细胞的增殖效率以及神经生长因子和神经胶质源性营养因子的合成. Ghasemi-Mobarakeh 等^[21]较早研究了电刺激对聚苯胺(polyaniline, PANI)/ 聚 ϵ -己内酯(poly(ϵ -caprolactone, PCL)/ 明胶(gelatin)导电纳米纤维支架上 NSCs 增殖和神经突触生长的促进作用. Prabhakaran 等^[29]利用 PANI / 聚 L- 乳酸(poly(L-lactide), PLLA)导电纳米纤维支架得到了相同的结果. 最近 Bechara 等^[47]研发了一种导电表面, 在聚己酸内酯(polycaprolactone, PCL)纳米线表面铺上聚吡咯(polymer polypyrrole, PPy)构成导电表面, PPy 降低了纳米线表面的电阻率从而利于电流在表面的传导, 结果显示 PPy-NW 表面能显著促进 c17.2 NSCs 增殖、黏附以及向神经细胞分化的能力.

1.4 神经分化

电刺激在体外可以促进干细胞向神经细胞方向分化. Yamada 等^[31]研究发现, 微弱电刺激能强烈地促进 ESCs 向神经元分化, 且比其他生长因子诱导所需时间更短, 尽管这些神经元细胞并不具有特殊的终端分化信号, 但是它们却展现了向各种类型神经元分化的潜能, 而这种能力对神经损伤的修复非常有利. 他们进一步研究证明电刺激促进 ESCs 向神经元分化的可能机制是通过影响拟胚体(embryoid bodies, EBs)中钙离子通道的活性来激活其分化能力. 此外, 在诱导 ESCs 分化的研究中还发现生长因子诱导产生的细胞类型经常受到限制, 而电刺激却可以控制 ESCs 向多种细胞分化. Yamada 等^[31]还发现, 改变电压的大小就可以控制电刺激对 ESCs 的胚状体向神经元分化的影响, 当电压为 10 V 时, 几乎所有的胚状体集落所包含的

细胞都表达神经元标记物 Tuj1, 然而当电压变为 0 V 时, 只有 10% 的细胞表达 Tuj1, 当电压超过 10 V 时表达 Tuj1 的细胞数目又开始下降. 除了能促进胚胎干细胞的分化之外, 电刺激还能影响其他干细胞的分化, Chang 等^[22]利用双相电流刺激器芯片和铟锡氧化物(indium tin oxide, ITO)电极制成的双相电流系统作用于 NSCs 后发现, 双相电流能明显加强 NSCs 的增殖, 同时还能促进 NSCs 向神经元的分化. 另外双相电流也可促进人 MSCs 向施旺细胞分化^[30].

2 展 望

电刺激因使用方便、无创和副作用小等优点越来越受到周围神经修复领域中研究者的青睐, 已成为临床周围神经修复的辅助治疗方法. 干细胞因具有自我更新、多向分化潜能以及来源较广等优点已经成为组织工程方法修复周围神经损伤的主要细胞来源, 电刺激联合干细胞在体内外的神经修复研究中取得的成果显示了二者的联合应用在周围神经损伤修复中所蕴含的潜力. 尽管已经发现电刺激具有促进干细胞黏附、迁移、增殖以及向神经元方向分化的能力, 同时在与干细胞联合应用时能显著提高损伤神经的修复效果, 但是电刺激联合干细胞在周围神经修复中的研究尚处于起步阶段, 仍有许多问题亟待进一步解决.

首先, 虽然已经证明电刺激可调控干细胞的增殖、分化等特性, 但是对电刺激作用于干细胞的具体机制并不完全清楚. 已有研究表明电刺激影响干细胞分化可能跟信号通路的调控相关, 比如电刺激可以通过影响钙离子通道活性引导干细胞的分化^[31], Wnt 和 Notch 等信号分子也可调控干细胞向着神经细胞分化^[48]. 另外还发现电刺激能激活热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)控制 NeuroD2 的瞬间表达, 使得老鼠的成神经细胞瘤细胞转化为分化的神经元^[49]. 最近 Afzal 等^[50]指出热激蛋白可以在生理和病理条件下对老鼠胚胎肿瘤干细胞(embryonal carcinoma stem cells)的神经分化进行调控. 那么电刺激在改变干细胞钙离子通道活性后又是如何控制其分化? 该过程涉及哪些信号通路? 电刺激在发挥其促分化功能时是否跟调节干细胞向神经分化的信号通路如 Wnt 信号通路、Notch 信号通路相关? 电刺激在作用于干细胞时是否也能调控热激蛋白的表达以控制干细胞的分化? 这些疑问有待于进一步系统实验的验证.

再者, 目前联合电刺激与干细胞修复损伤周围神经的研究中所采用的刺激装置多为实验室根据实验要求自行设计的, 刺激参数和方式多不相同(详见网络版附录 http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20110467&flag=1), 这为对比实验结果带来一定的困难, 特别是在对单个细胞受到的电刺激强度难以测量的情况下. 例如 Ghasemi-Mobarakeh 等^[21]和 Prabhakaran 等^[29]虽然利用相同的电刺激装置和相同的刺激强度, 但是由于导电纳米纤维支架的电特性不一致, 使得施加在干细胞上的刺激强度仍有较大的差异. 电刺激装置的研发和具体参数的确定也是研究的关键. 虽然目前有多种体外电刺激装置包括直接电极连接培养液或通过盐桥连接刺激细胞以及生物反应器构建二维电刺激系统等, 但是这些装置都无法较好地模拟干细胞在体内受到的电刺激, 因此设计三维刺激系统(比如 Pavesi 等^[51]设计的微流体装置)可能是今后体外研究电刺激作用于干细胞的趋势. 研究体内植入式电极^[52]和导电性纳米材料^[29]也将是这一领域发展的必然趋势.

最后, 目前还需要更多的体内实验证实电刺激联合干细胞在周围神经损伤修复中的作用. 虽然体外研究中电刺激联合干细胞显示出了较好的应用前景, 且在脑损伤和脊髓损伤修复中应用较广^[53-58], 但是目前体内研究中电刺激联合干细胞在周围神经损伤修复的报道较少. 此外, 电刺激作用于干细胞的机制比较复杂, 其可能参与了包括细胞因子和生长因子在内的生物化学环境共同组成的细胞生长微环境, 可能对细胞因子等生物化学信息提供补充或协调作用^[59].

虽然目前电刺激联合干细胞修复周围神经损伤的研究尚处于起步阶段, 但是它所蕴含的巨大潜能有望为周围神经修复探索出可行的高效修复方法和技术.

参 考 文 献

- [1] Park H, Yip M C, Chertok B, *et al.* Indirect low-intensity ultrasonic stimulation for tissue engineering. *J Tissue Eng*, 2010: Article ID 973530
- [2] Raso V V, Barbieri C H, Mazzer N, *et al.* Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves?. *J Neurosci Methods*, 2005, **142**(2): 185-192
- [3] Noble J, Munro C A, Prasad V S, *et al.* Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma*, 1998, **45**(1): 116-122
- [4] Deumens R, Bozkurt A, Meek M F, *et al.* Repairing injured peripheral nerves: bridging the gap. *Prog Neurobiol*, 2010, **92**(3): 245-276
- [5] Kelsey J L, Praemer A, Nelson L, *et al.* Upper Extremity Disorders: Frequency, Impact, and Cost. New York: Churchill Livingstone, 1997
- [6] Mohanna P N, Young R C, Wiberg M, *et al.* A composite poly-hydroxybutyrate-glia growth factor conduit for long nerve gap repairs. *J Anat*, 2003, **203**(6): 553-565
- [7] 宋晓雄, 布林. 细胞外 ATP 联合前列腺素 E1 对周围神经再生的影响. *中国民族民间医药*, 2009, **18**(4): 17-18
- [8] Song X X, Bu L. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2009, **18**(4): 17-18
- [8] 张立新, 佟晓杰, 贾桦, 等. 超短波对大鼠周围神经缺损修复术后神经再生的影响. *中国康复医学杂志*, 2009, **24**(8): 695-698
- [9] Zhang L X, Tong X J, Jia H, *et al.* *Chin J Rehabil Med*, 2009, **24**(8): 695-698
- [9] Seddon H J. Three types of nerve injury. *Brain*, 1943, **66** (4): 237-288
- [10] Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*, 1951, **74**(4): 491-516
- [11] Gu X S, Ding F, Yang Y M, *et al.* Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog Neurobiol*, 2011, **93**(2): 204-230
- [12] Battiston B, Geuna S, Ferrero M, *et al.* Nerve repair by means of tubulization: Literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery*, 2005, **25**(4): 258-267
- [13] Muschler G F, Nakamoto C, Griffith L G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*, 2004, **86-A**(7): 1541-1558
- [14] de Ruiter G C W, Malesky M J, Yaszemski M J, *et al.* Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus*, 2009, **26**(2): E5
- [15] Shimada I S, Spees J L. Stem and progenitor cells for neurological repair: Minor issues, Major hurdles, and exciting opportunities for paracrine-based therapeutics. *J Cell Biochem*, 2011, **112**(2): 374-380
- [16] 李强, 李民, 伍亚民. 物理因子影响周围神经再生的研究概况. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, **25**(3): 186-188
- [16] Li Q, Li M, Wu Y M. *Chin J Phys Med Rehabil*, 2003, **25** (3): 186-188
- [17] Ahlborn P, Schachner M, Irintchev A. One hour electrical stimulation accelerates functional recovery after femoral nerve repair. *Exp Neurol*, 2007, **208**(1): 137-144
- [18] Al-Majed A A, Tam S L, Gordon T. Electrical stimulation accelerates and enhances expression of regeneration-associated genes in regenerating rat femoral motoneurons. *Cell Mol Neurobiol*, 2004, **24**(3): 379-402
- [19] Geremia N M, Gordon T, Brushart T M, *et al.* Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *Exp Neurol*, 2007, **205**(2): 347-359
- [20] Gordon T, Brushart T M, Chan K M. Augmenting nerve

- regeneration with electrical stimulation. *Neurol Res*, 2008, **30**(10): 1012-1022
- [21] Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran M P, Morshed M, *et al.* Electrical stimulation of nerve cells using conductive nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 2009, **15**(11): 3605-3619
- [22] Chang K A, Kim J W, Kim J A, *et al.* Biphasic electrical currents stimulation promotes both proliferation and differentiation of fetal neural stem cells. *PLoS One*, 2011, **6**(4): e18738
- [23] 张立宁, 王兴林. 电刺激对周围神经再生的影响. *中国康复理论与实践*, 2006, **12**(7): 588-590
- Zhang L N, Wang X L. *Chin J Rehabil Theor Pract*, 2006, **12**(7): 588-590
- [24] 林 森, 徐建光. 功能性电刺激在周围神经损伤修复中的研究进展. *中国修复重建外科杂志*, 2005, **19**(8): 669-672
- Lin S, Xu J G. *Chin J Reparat Reconstr Surg*, 2005, **19**(8): 669-672
- [25] Shi G, Zhang Z, Rouabhia M. The regulation of cell functions electrically using biodegradable polypyrrole-polylactide conductors. *Biomaterials*, 2008, **29**(28): 3792-3798
- [26] Sun S, Titushkin I, Cho M. Regulation of mesenchymal stem cell adhesion and orientation in 3D collagen scaffold by electrical stimulus. *Bioelectrochemistry*, 2006, **69**(2): 133-141
- [27] Kim J, Han S J, Shin D H, *et al.* Subthreshold continuous electrical stimulation facilitates functional recovery of facial nerve after crush injury in rabbit. *Muscle Nerve*, 2011, **43**(2): 251-258
- [28] Arocena M, Zhao M, Collinson J M, *et al.* A time-lapse and quantitative modelling analysis of neural stem cell motion in the absence of directional cues and in electric fields. *J Neurosci Res*, 2010, **88**(15): 3267-3274
- [29] Prabhakaran M P, Ghasemi-Mobarakeh L, Jin G, *et al.* Electrospun conducting polymer nanofibers and electrical stimulation of nerve stem cells. *J Biosci Bioeng*, 2011, **112**(5): 501-507
- [30] Kim I S, Song Y M, Cho T H, *et al.* Biphasic electrical targeting plays a significant role in schwann cell activation. *Tissue Eng Part A*, 2011, **17**(9-10): 1327-1340
- [31] Yamada M, Tanemura K, Okada S, *et al.* Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2007, **25**(3): 562-570
- [32] Robert L. Matrix biology: past, present and future. *Pathol Biol (Paris)*, 2001, **49**(4): 279-283
- [33] Yu L M Y, Leipzig N D, Shoichet M S. Promoting neuron adhesion and growth. *Materials Today*, 2008, **11**(5): 36-43
- [34] Saltó C, Saindon E, Bolin M, *et al.* Control of neural stem cell adhesion and density by an electronic polymer surface switch. *Langmuir*, 2008, **24**(24): 14133-14138
- [35] Gabi M, Larmagnac A, Schulte P, *et al.* Electrically controlling cell adhesion, growth and migration. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, **79**(2): 365-371
- [36] Larsen C C, Kligman F, Kottke-Marchant K, *et al.* The effect of RGD fluorosurfactant polymer modification of ePTFE on endothelial cell adhesion, growth, and function. *Biomaterials*, 2006, **27**(28): 4846-4855
- [37] Barlow S M, Raval R. Complex organic molecules at metal surfaces: bonding, organisation and chirality. *Surf Sci Rep*, 2003, **50**(6-8): 201-341
- [38] Shen J W, Wu T, Wang Q, *et al.* Molecular simulation of protein adsorption and desorption on hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials*, 2008, **29**(5): 513-532
- [39] Tandon N, Goh B, Marsano A, *et al.* Alignment and elongation of human adipose-derived stem cells in response to direct-current electrical stimulation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2009, 6517-6521
- [40] Traynor A E, Schubert D. Phospholipases elevate cyclic AMP levels and promote neurite extension in a clonal nerve cell line. *J Tissue Eng Regen Med Brain Res*, 1984, **316**(2): 197-204
- [41] Schense J C, Hubbell J A. Three-dimensional migration of neurites is mediated by adhesion site density and affinity. *J Biol Chem*, 2000, **275**(10): 6813-6818
- [42] Gunn J W, Turner S D, Mann B K. Adhesive and mechanical properties of hydrogels influence neurite extension. *J Biomed Mater Res A*, 2005, **72**(1): 91-97
- [43] Patel N, Poo M M. Orientation of neurite growth by extracellular electric fields. *J Neurosci*, 1982, **2**(4): 483-496
- [44] Zhao Z Q, Qin L, Reid B, *et al.* Directing migration of endothelial progenitor cells with applied DC electric fields. *Stem Cell Res*, 2011, doi: 10.1016/j.scr.2011.08.001
- [45] Li L, El-Hayek Y H, Liu B S, *et al.* Direct-current electrical field guides neuronal stem/progenitor cell migration. *Stem Cells*, 2008, **26**(8): 2193-2200
- [46] Zhang J, Calafiore M, Zeng Q, *et al.* Electrically guiding migration of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev*, 2011, **7**(4): 987-996
- [47] Bechara S, Wadman L, Popat K C. Electroconductive polymeric nanowire templates facilitates *in vitro* C17.2 neural stem cell line adhesion, proliferation and differentiation. *Acta Biomater*, 2011, **7**(7): 2892-2901
- [48] Cardozo A J, Gómez D E, Argibay P F. Transcriptional characterization of Wnt and notch signaling pathways in neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *J Mol Neurosci*, 2011, **44**(3): 186-194
- [49] Mie M, Endoh T, Yanagida Y, *et al.* Induction of neural differentiation by electrically stimulated gene expression of NeuroD2. *J Biotechnol*, 2003, **100**(3): 231-238
- [50] Afzal E, Ebrahimi M, Najafi S M, *et al.* Potential role of heat shock proteins in neural differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells (P19). *Cell Biol Int*, 2011, **35**(7): 713-720
- [51] Pavesi A, Piraino F, Fiore G B, *et al.* How to embed three-dimensional flexible electrodes in microfluidic devices for cell culture applications. *Lab Chip*, 2011, **11**(9): 1593-1595
- [52] Wu W L, Zhao H, Xie B, *et al.* Implanted spike wave electric stimulation promotes survival of the bone marrow mesenchymal stem cells and functional recovery in the spinal cord injured rats. *Neurosci Lett*, 2011, **491**(1): 73-78
- [53] 薛玉仙, 高剑峰, 刘 轲. 电针干预对老龄大鼠脑缺血再灌注海

- 马齿状回内源性神经干细胞增殖分化的影响. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2009, **16**(5): 1-5
- Xue Y X, Gao J F, Liu K. J Beijing Univ Tradit Chinese Med(Clin Med), 2009, **16**(5): 1-5
- [54] Ding Y, Yan Q, Ruan J W, *et al.* Electro-acupuncture promotes survival, differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells as well as functional recovery in the spinal cord-transected rats. BMC Neurosci, 2009, 10: 35(doi:10.1186/1471-2202-10-35)
- [55] Yan Q, Ruan J W, Ding Y, *et al.* Electro-acupuncture promotes differentiation of mesenchymal stem cells, regeneration of nerve fibers and partial functional recovery after spinal cord injury. Exp Toxicol Pathol, 2011, **63**(1-2): 151-156
- [56] Chen Y Y, Zhang W, Chen Y L, *et al.* Electro-Acupuncture improves survival and migration of transplanted neural stem cells in injured spinal cord in rats. Acupunct Electrother Res, 2008, **33**(1-2): 19-31
- [57] Liu Z, Ding Y, Zeng Y S. A new combined therapeutic strategy of governor vessel electro-acupuncture and adult stem cell transplantation promotes the recovery of injured spinal cord. Current Medicinal Chemistry, 2011, **18**(33): 5165-5171
- [58] 赵 华, 陈允震, 刘海春, 等. 自体骨髓基质干细胞移植联合电刺激治疗脊髓损伤的实验研究. 中国矫形外科杂志, 2010, **18**(12): 1019-1022
- Zhao H, Chen Y Z, Liu H C, *et al.* Orthop J China, 2010, **18**(12): 1019-1022
- [59] 刘 然, 范洪学, 刘世文. 物理治疗因子对干细胞调控机制的影响. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, **14**(23): 4319-4324
- Liu R, Fan H X, Liu S W. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2010, **14**(23): 4319-4324

Research Advancement on Injured Peripheral Nerve Regeneration by Stem Cells Combined With Electrical Stimulation*

ZHAO Peng-Cheng^{1,2)}, LÜ Yong-Gang^{1,2)**}, ZOU Yang^{1,2)}, ZHANG Xiao-Mei^{1,2)}, CHEN Guo-Bao^{1,2)}, YANG Li^{1,2)}

⁽¹⁾ Key Laboratory of Biorheological Science and Technology (Chongqing University), Ministry of Education, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

²⁾ "111" Project Laboratory of Biomechanics and Tissue Repair, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract Injury of peripheral nerve is very common in trauma, which easily causes partial or whole damage to peripheral nerves and will further result in function loss or other neurological diseases. With the development of technology, the treatment efficacy of peripheral nerve injury has been improved significantly. However, it is still very difficult to obtain the morphologic and functional regeneration. Slow rates of nerve regeneration and functional recovery are still the difficulty in clinics. Electrical stimulation is convenient, non-invasive and with few side effects. More and more researchers have paid attention to using stem cells combined with electrical stimulation to repair injured peripheral nerve. In this study, the applications and advancement of using stem cells combined with electrical stimulation in injured peripheral nerve regeneration were comprehensively reviewed. The possible mechanisms of them were further discussed. Particularly, the difficulties of using stem cells combined with electrical stimulation to repair injured peripheral nerve were analyzed. Prospect along this direction was also discussed.

Key words peripheral nerve, stem cell, electrical stimulation, regeneration, bioreactor

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00467

* This work was supported by grants from The Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-10-0879), The National Natural Science Foundation of China (11172338), The Key Science and Technology Program of CQ CSTC (2009AA5045), The Scientific Research Foundation for The Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, The Sharing Fund of Chongqing University's Large-scale Equipment, and The Fundamental Research Funds of The Central Universities (CDJXS112300).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-65111632, E-mail: yglv@cqu.edu.cn

Received: December 12, 2011 Accepted: December 31, 2011

附录

电刺激干细胞装置

电刺激形式可以分为施加恒定电场和恒定电流作用两种^[4], 具体的参数数值可以参见 Ghasemi-Mobarakeh 等^[2]最近的综述. Shi 等^[1]在导电聚合物支架中发现恒定电场比恒定电流(只有很小的电场强度)更易调节细胞行为, 但在电容或盐桥类装置里, 因介质的电导率相对稳定, 电场和电流是可以互换的. 几种典型的刺激装置如图 S1 所示, 在离体细胞实验中可使用电极直接与培养液连接(图 S1a)^[3]或者利用盐桥连接(图 S1b)^[4], 使用电极直接与培养液连接时电极一般由银、金或铂等制作, 为了方便在显微镜观察也有用 ITO 导电玻璃作为电极(图 S1a). 为了减少电解产物对培养液的污染和 pH 值的改变, 可将琼脂凝胶盐桥两端分别放入培养液和相应盐溶液(如 Ag/AgCl), 盐溶液里的电极和电源连接(图 S1b). 随着微纳米技术的发展, 也出现了各类微生物反应器, 如图 S1c 所示微生物反应器由聚二甲基硅氧烷 (poly(dimethylsiloxane), PDMS) 立体光刻成型而成, 通过等离子处理黏附在 75 mm×25 mm 载玻片上, 载玻片是透光的, 可以适时观察细胞^[5]. 微生物反应器包含 4×4 个小培养室, 每排小培养室两边放置直径为 1.3 mm 电极. 由于 PDMS 绝缘, 可以独立对每排小培养室单独进行电刺激. 图 S1d 为表面雕刻电极生物反应器 (surface-patterned electrode bioreactor)^[6], 基于准分子激光技术获得微影图案 ITO 基质 (micropatterned indium tin oxide substrate), 然后将得到的 ITO 条带制成插指电极阵列, 随后与 PDMS 制成两个培养孔构成生物反应器. 图 S1e 是由平行板流动腔 (parallel-plate flow chamber) 改装的电刺激装置^[7], 流动腔两端管子用琼脂糖-盐桥代替接通电源. 除此之外, 还有直接

通过电极刺激干细胞的装置. 图 S1f 为一种用于刺激干细胞的插指电极 (interdigitated electrode, IDE) 装置^[8], 插指电极由两块黄金接触垫 (gold contact pads) 构成, 每块垫子由 25 个梳齿 (digits) 连接而成, 而且每个梳齿之间的距离只有 100 μm , 这样的设计不仅方便使用低频电压产生生理电场, 而且能避免电化学效应的产生. 应用二维的插指电极刺激干细胞有 3 个优点: a. 因为电极固定在基底所以它可以产生便于控制以及量化较好的刺激电流; b. 电极尺寸小、易制作, 同时仅需要较小的电压便可产生生理电场的强度; c. 电极具有敞开的性质便于刺激时的观察, 同时还可以找出短期反应 (short-term responses) (如胞质中钙含量上升) 与长期反应 (longer-term effects) (如终产物的表达) 之间的一一对应关系.

近年来, 在二维培养电刺激的基础上发展了三维培养电刺激系统, 图 S1g 为 Sun 等^[9]研发的一种用于研究电刺激对三维培养条件下细胞黏附和定向影响的实验装置, 电刺激仍通过盐桥连接实现. 利用微加工技术可以进一步将电极嵌入微流体装置, 目前最常用的方法是将图案化的金属镀膜贴于玻璃衬底上构成电极, 随后再将电极直线排列到 PDMS 制成的微流体装置. Pavesi 等^[10]进一步做了改进, 成功地将三维柔韧性电极嵌入微流体装置中制成了三维灵活性电极系统, 从而在细胞微环境中实现了均匀电场 (图 S1h), 装置由 PDMS 通过软刻技术与化学侵蚀联合制成, 电极由 PDMS 与碳纳米管混合物组成. 此外在在体实验中, 发展力学、生物学和电学性能均良好的导电导管是推广电刺激在临床上应用的一个重要途径^[2].

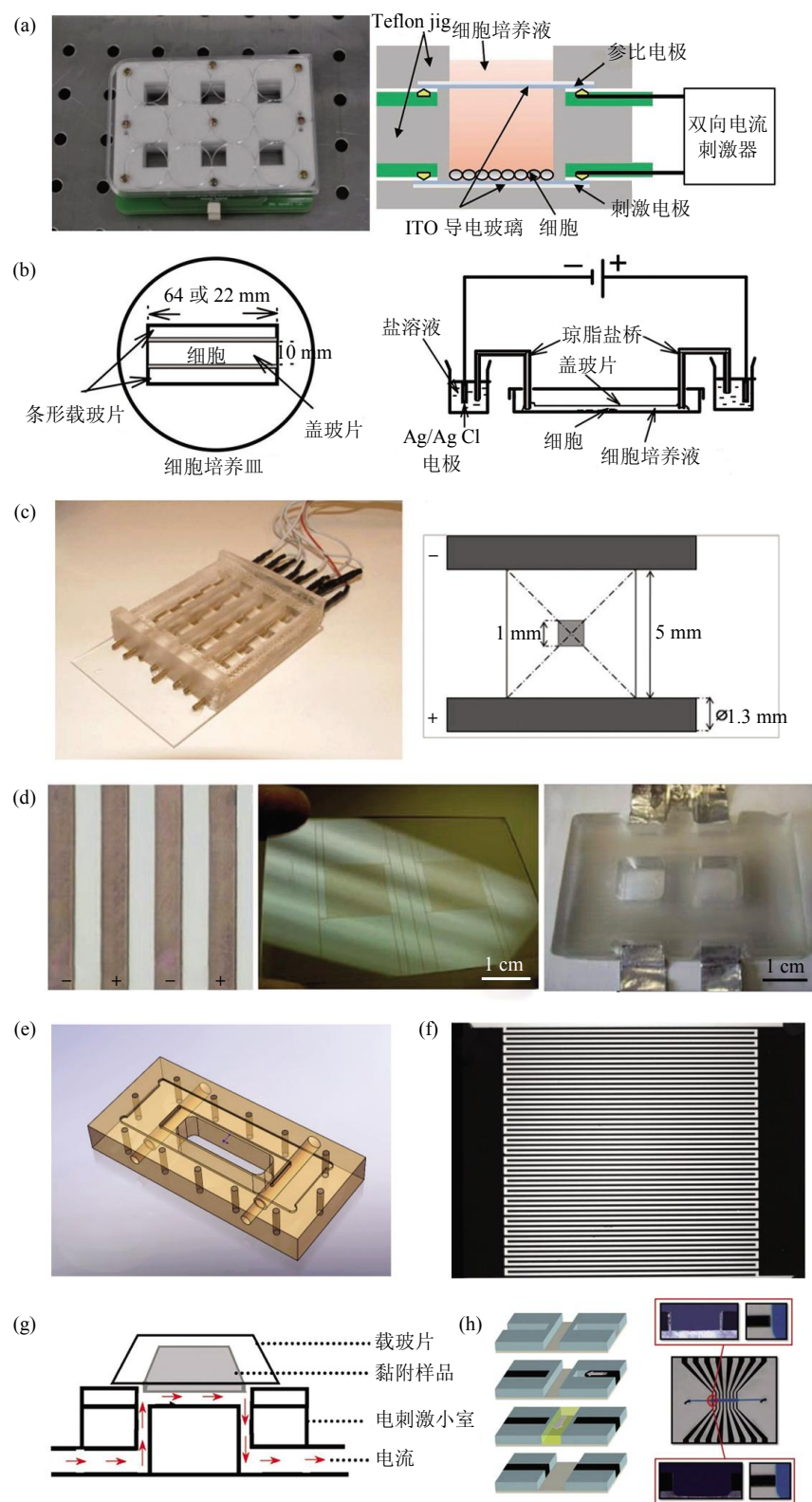


Fig. S1 Typical methods to apply electrical stimulation on stem cells

图 S1 对干细胞施加电刺激的典型方法

(a) 离体培养系统(直接连接)(修改自文献[3]). (b) 离体培养系统(盐桥连接)(修改自文献[4]). (c) 电刺激生物反应器^[5]. (d) 表面雕刻电极生物反应器^[6]. (e) 类平行板流动腔装置^[7]. (f) 插指电极装置^[8]. (g) 三维电刺激腔(修改自文献[9]). (h) 微流体装置系统^[10].

参 考 文 献

- [1] Shi G, Rouabhia M, Meng S, *et al.* Electrical stimulation enhances viability of human cutaneous fibroblasts on conductive biodegradable substrates. *J Biomed Mater Res A*, 2008, **84** (4): 1026–1037
- [2] Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran M P, Morshed M, *et al.* Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011, **5**(4): e17–e35
- [3] Chang K A, Kim J W, Kim J A, *et al.* Biphasic electrical currents stimulation promotes both proliferation and differentiation of fetal neural stem cells. *PLoS One*, 2011, **6**(4): e18738
- [4] Zhao M, Agius-Fernandez A, Forrester J V, *et al.* Orientation and directed migration of cultured corneal epithelial cells in small electric fields are serum dependent. *J Cell Sci*, 1996, **109** (Pt 6): 1405–1414
- [5] Serena E, Figallo E, Tandon N, *et al.* Electrical stimulation of human embryonic stem cells: Cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species. *Exp cell Res*, 2009, **315**(20): 3611–3619
- [6] Tandon N, Marsano A, Maidhof R, *et al.* Surface-patterned electrode bioreactor for electrical stimulation. *Lab Chip*, 2010, **10** (6): 692–700
- [7] Tandon N, Goh B, Marsano A, *et al.* Alignment and elongation of human adipose-derived stem cells in response to direct-current electrical stimulation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2009: 6517–6521
- [8] McCullen S D, McQuilling J P, Grossfeld R M, *et al.* Application of low-frequency alternating current electric fields via interdigitated electrodes: Effects on cellular viability, cytoplasmic calcium, and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, **16**(6): 1377–1386
- [9] Sun S, Titushkin I, Cho M. Regulation of mesenchymal stem cell adhesion and orientation in 3D collagen scaffold by electrical stimulus. *Bioelectrochemistry*, 2006, **69**(2): 133–141
- [10] Pavesi A, Piraino F, Fiore G B, *et al.* How to embed three-dimensional flexible electrodes in microfluidic devices for cell culture applications. *Lab Chip*, 2011, **11**(9): 1593–1595