

吡咯喹啉醌对许旺细胞增殖及Sox10表达的影响*☆

贺斌, 刘世清, 李皓桓

Effects of pyrroloquinoline quinone on Schwann cells proliferation and Sox10 expression

He Bin, Liu Shi-qing, Li Hao-huan

Department of
Orthopedics, Renmin
Hospital of Wuhan
University, Wuhan
430060, Hubei
Province, China

He Bin☆, Studying
for doctorate,
Department of
Orthopedics, Renmin
Hospital of Wuhan
University, Wuhan
430060, Hubei
Province, China
hebin_0203@163.
com

Correspondence to:
Liu Shi-qing,
Professor, Doctoral
supervisor,
Department of
Orthopedics, Renmin
Hospital of Wuhan
University, Wuhan
430060, Hubei
Province, China
liu_shiqing2009@163.
com

Supported by: the
National Natural
Science Foundation
of China, No.
30600627*

Received: 2009-12-30
Accepted: 2010-03-27

Abstract

BACKGROUND: Schwann cells are seed cells of nerve tissue engineering, but they grow slowly *in vitro*, and can not satisfy the need of scientific research and clinical application. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) can promote proliferation of some kinds of cells.
OBJECTIVE: To investigate the effects of PQQ on Schwann cells proliferation and Sox10 expression.
METHODS: Schwann cells were cultured and purified *in vitro*. The purity of Schwann cells was identified by immunofluorescence of S-100. After serum-free culture for 12 hours, 10 nmol/L PQQ was added into cultured Schwann cells, and the morphological changes were detected under PQQ treated. Different concentrations of PQQ (0, 1, 10, 100, 1 000, 10 000 nmol/L) were added into culture medium for 24 hours, then the expression of Sox10 mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction.
RESULTS AND CONCLUSION: PQQ could affect the morphology of Schwann cells, showing bundle-shaped and side by side growing, and promote Schwann cell proliferation. 1~1 000 nmol/L PQQ could up-regulate the expression of Sox10 mRNA on cultured Schwann cells; the maximal effect occurred on 100 nmol/L PQQ; 10 000 nmol/L PQQ exhibited the depressed effect on expression of Sox10 on cultured Schwann cells ($P < 0.05$).

He B, Liu SQ, Li HH. Effects of pyrroloquinoline quinone on Schwann cells proliferation and Sox10 expression. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(19): 3554-3557. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 许旺细胞是神经组织工程的种子细胞,但其体外增殖缓慢,难以满足科研与临床对其的需要,而吡咯喹啉醌可以对多种细胞的增殖产生促进作用。
目的: 观察吡咯喹啉醌对许旺细胞的增殖作用并探讨其对许旺细胞 Sox10 基因表达的影响。
方法: 体外培养及纯化大鼠许旺细胞, S-100 免疫荧光鉴定许旺细胞;细胞经无血清培养 12 h 后,加入 10 nmol/L 吡咯喹啉醌继续培养 24 h 观察其形态学改变;加入不同浓度(0, 1, 10, 100, 1 000, 10 000 nmol/L)吡咯喹啉醌于许旺细胞培养 24 h,利用 RT-PCR 技术检测 Sox10 的 mRNA 表达。
结果与结论: 吡咯喹啉醌促使许旺细胞发生形态学改变,多数呈束状或并排生长,且细胞数目增多;1~1 000 nmol/L 吡咯喹啉醌可使许旺细胞 Sox10 mRNA 表达增高,100 nmol/L 时表达最高;10 000 nmol/L 时对 Sox10 的表达表现为抑制作用($P < 0.05$)。
关键词: 吡咯喹啉醌;许旺细胞;增殖;Sox10;大鼠
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.19.027

贺斌, 刘世清, 李皓桓. 吡咯喹啉醌对许旺细胞增殖及 Sox10 表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(19):3554-3557. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

许旺细胞是周围神经系统的主要胶质细胞,来源于神经嵴,由原始许旺细胞前体分化为髓鞘形成细胞或非髓鞘形成细胞^[1],在周围神经损伤、再生和修复过程中发挥关键作用^[2]。神经损伤的修复或重建是显微外科的常见问题,最大程度恢复神经损伤所致的功能障碍是神经损伤修复的目标。近年发展起来的神经再生组织工程为修复损伤神经提供了一种新方法;其中作为种子细胞的许旺细胞被广泛研究^[3-5]。由于许旺细胞体外增殖速度缓慢,而神经再生工程又需要在短期内提供大量许旺细胞,因此体外短时

间内培养大量高纯度许旺细胞成了该研究领域的难点。吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)是一种不依赖于NAD(P)和FAD的葡萄糖脱氢酶辅基,在生物体内可发挥多种生物学效应:加快动物生长发育、细胞增殖、保护神经细胞并促进神经生长因子分泌^[6]。已有学者将PQQ应用于损伤的周围神经,研究发现它可促进周围神经修复及再生,将PQQ作用于体外培养的许旺细胞发现其可以促进许旺细胞增殖及生长因子的分泌^[7-10]。许旺细胞的增殖需要多种转录因子的参与,其中Sox10(SRY同源盒基因10)是参与许旺细胞早期发展的一个重要转录因子^[11-12]。实验通过观察PQQ促进体外培养许旺细胞增殖及形态

学的影响, 并检测PQQ对体外培养许旺细胞早期激活转录因子Sox10表达的影响, 旨在为PQQ用于神经再生组织工程提供大量种子细胞奠定基础。

1 材料和方法

设计: 观察性实验, 细胞学体外培养。

时间及地点: 实验于2009-01/04在武汉大学人民医院中心实验室完成。

材料: 出生3~5 d的SD大鼠20只, 由武汉大学医学部实验动物中心提供(动物质量合格证号: SYXK(鄂)2003_0013), 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[13]。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12培养基	Hyclone
胎牛血清	美国Gibco公司
胰蛋白酶、II型胶原酶	美国Sigma公司
Trizol、PCR引物	Invitrogen
RT-PCR试剂盒	Fermentas

实验方法:

许旺细胞培养基纯化: 取出生3~5 d SD大鼠, 按照Brookes等^[14]的描述, 在显微镜下无菌剥离双侧坐骨神经, D-Hank's液漂洗后移入混合酶液(0.25%胰酶/0.03% II型胶原酶)中消化40 min, 离心, 弃上清后加入DMEM/F12培养液(含体积分数为10%胎牛血清), 于37 °C, 含体积分数为5%CO₂的培养箱中培养, 30 min后用差速贴壁法去除成纤维细胞, 并于24 h后加入100 μL阿糖胞苷(Ara-C, 10⁻⁵ mmol/L)联合使用不同的胶原酶处理来纯化许旺细胞^[15]。

许旺细胞鉴定: PBS洗涤细胞3次, 4 °C、40 g/L多聚甲醛固定10 min; PBS洗涤3次; 加入1% Triton-100, 37 °C孵育20 min, PBS洗涤1次; 正常羊血清封闭5 min, PBS洗涤1次; 加入兔抗大鼠S-100抗体, 4 °C过夜; PBS洗涤3次; 加羊抗兔IgG-FITC, 37 °C避光孵育30 min, PBS洗涤3次(避光); 荧光显微镜下观察S-100免疫荧光标记阳性细胞并计数, 胞浆呈绿色者为阳性细胞^[16]。

RT-PCR检测Sox10基因mRNA表达: 采用无血清饥饿法培养许旺细胞达12 h, 选择细胞密

度相同的6组细胞, 其中每组均重复3次。在6孔中分别加入0, 1, 10, 100, 1 000, 10 000 nmol/L的PQQ(0 nmol/L PQQ作对照), 置于37 °C、含体积分数为5%CO₂的培养箱中培养24 h; 用Trizol法提取各组细胞的总RNA, 按照Fermentas试剂盒说明进行RT-PCR。

引物序列:

引物	序列	扩增片段
Sox10	上游: 5'-AGG ACG GCG AGG CAG ACG ATG-3'	468 bp
	下游: 5'-GGT GGT CCA GGT GGG CAC TCT TGT A-3'	
β-actin	上游: 5'-CCT GAC CGA GCG TGG CTA CAG C-3'	205 bp
	下游: 5'-AGC CTC AGG GCA TCG GAA C-3'	

反应环境: 94 °C×10 min, 94 °C变性30 s、退火30 s(退火温度: β-actin为55 °C, Sox10为58 °C)、72 °C延长30 s, 设30个循环; 72 °C×10 min。取产物置2%琼脂糖凝胶中电泳, 然后使用Bio-Rad图像软件分析。

主要观察指标: PQQ对许旺细胞形态变化及Sox10基因mRNA表达的影响。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一作者, 干预实施及结果评估为全部作者, 均经过系统培训, 未采用盲法评估。

2 结果

2.1 S-100免疫荧光鉴定许旺细胞 经S-100免疫荧光标记, 在荧光显微镜下可见许旺细胞呈绿色荧光, 体积较小, 有两极, 大多呈梭形, 实验中S-100标记许旺细胞显示其纯度> 90%, 见图1。

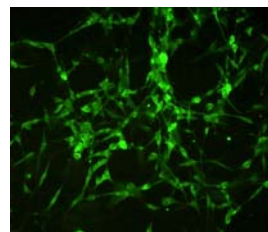


Figure 1 Immunofluorescence of S-100 of Schwann cells (×250)
图1 许旺细胞 S-100 免疫荧光鉴定(×250)

2.2 不同浓度PQQ对许旺细胞形态变化的影响 根据Theodor Schwann于1939年首次对

武汉大学人民医院骨科, 湖北省武汉市 430060

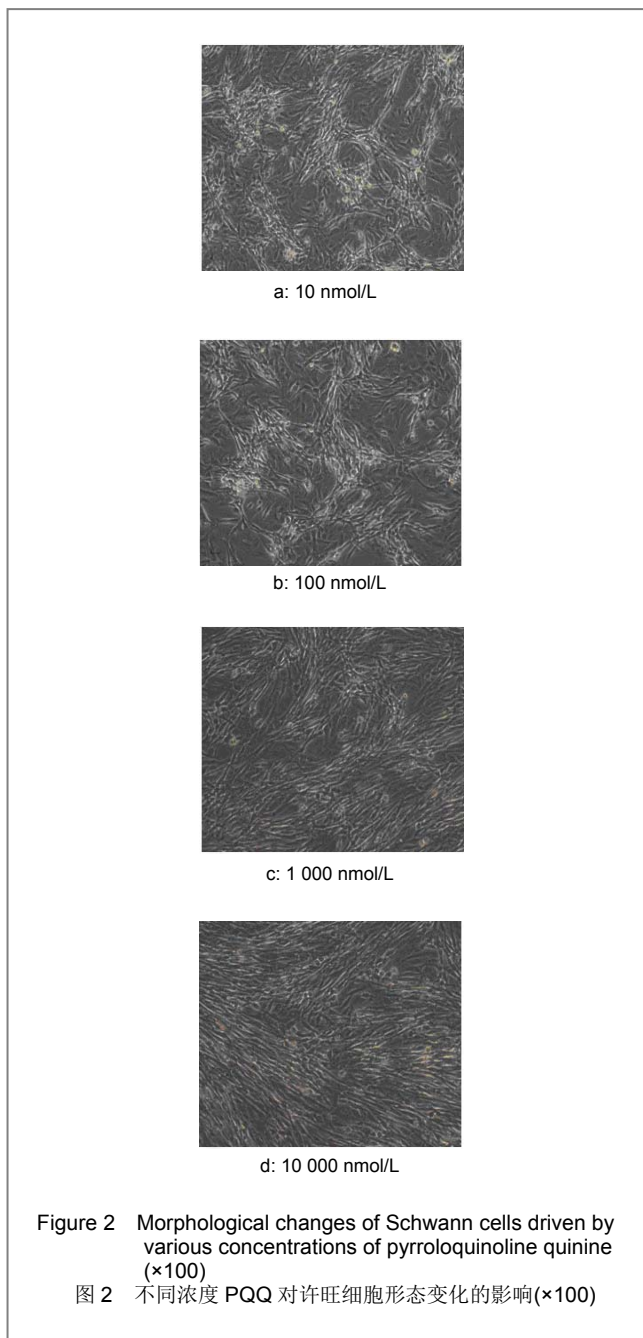
贺斌☆, 男, 1983年生, 湖北省武汉市人, 汉族, 武汉大学在读博士, 主要从事脊髓损伤与骨关节病的研究。
hebin_0203@163.com

通讯作者: 刘世清, 教授, 博士生导师, 武汉大学人民医院骨科, 湖北省武汉市 430060
liu_shiqing2009@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)19-03554-04

收稿日期 2009-12-30
修回日期 2010-03-27
(20090430002/WL-Q)

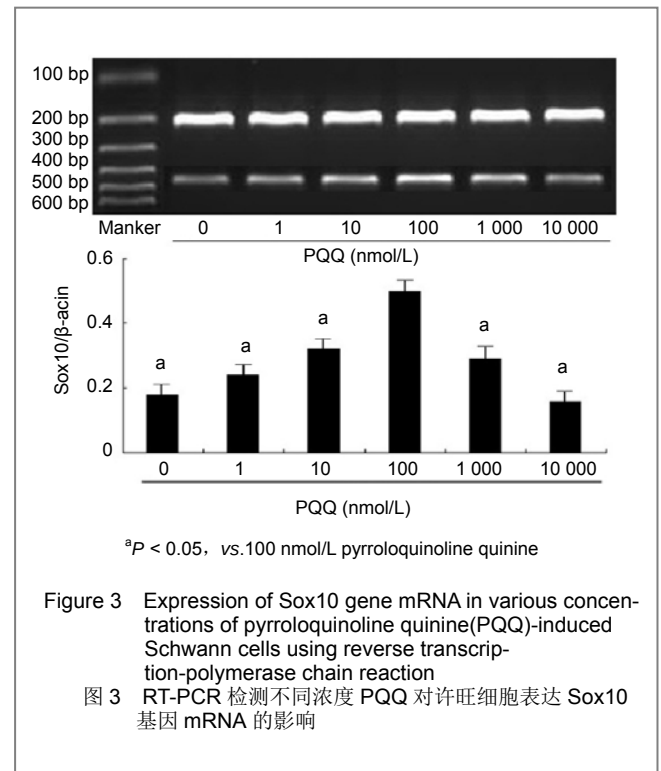
许旺细胞进行报道,在光镜下呈梭形、体积小、有两极,胞核明显、呈卵圆形。实验加入PQQ的浓度分别为1, 10, 100, 1 000, 10 000 nmol/L,加入PQQ前各组细胞均经过无血清培养使细胞均处于同一细胞周期,加入PQQ后24 h观察各组细胞长势并计数细胞克隆形成数,PQQ促进许旺细胞增殖主要是刺激细胞进入S期,缩短细胞从G₁期进入S期的时间,使分裂相的许旺细胞明显增多,进而促进其增殖;实验结果表明加入PQQ后各实验组在细胞长势及克隆形成等方面均较对照组好,细胞大多呈梭形,两端有两极,细胞数较少处多呈尖对尖或并排排列,较多处则呈簇状排列或呈圈状,见图2。



2.3 RT-PCR检测不同浓度PQQ对Sox10基因mRNA表达的影响

使用RT-PCR技术对Sox10基因mRNA

进行扩增,实验结果表明PQQ在一定浓度范围内(1~1 000 nmol/L之间)时可以使Sox10基因表达上调,当PQQ浓度为100 nmol/L时表达最高,与其他各组相比,差异有显著性意义($P < 0.05$);当PQQ浓度为10 000 nmol/L时Sox10的表达降低($P < 0.05$),此时PQQ表现为对上述基因表达的抑制作用,见图3。



3 讨论

许旺细胞是周围神经系统所特有的,也是最主要的胶质细胞,亦称神经膜细胞或鞘细胞,来源于胚胎时期的神经嵴细胞。其发育过程中先后经历许旺细胞前体、不成熟的许旺细胞两个阶段,最终发育成熟。许旺细胞功能极其活跃,它能分泌20多种蛋白质,包括数种神经营养因子,如神经生长因子、脑源性神经营养因子、睫状神经营养因子、成纤维细胞生长因子等,同时还产生细胞外基质和细胞黏附因子,对促进周围神经的生长发育、再生和修复起到重要作用。周围神经损伤是骨科创伤常见的问题,如何最大程度恢复和重建损伤神经是治疗神经损伤的主要目标。近年来运用组织工程技术移植许旺细胞修复损伤周围神经,已成为一种颇具应用前景的方案^[17-18]。组织工程技术需要在短期内增殖培养出大量纯化的许旺细胞,而单纯通过从神经分离培养所获取的许旺细胞数量稀少、周期长,再加上许旺细胞本身生长缓慢,因此依靠单纯分离培养无法满足基础与临床研究对许旺细胞的需求。因此需要寻找适宜的刺激许旺细胞增殖因子,短期内培养大量高纯度许旺细胞具有十

分重要的意义。PQQ是一种不依赖于NAD(P)和FAD的葡萄糖脱氢酶辅基, 其结构式为4, 5-二氢-4, 5-二氢-吡咯并(2, 3-f)喹啉-2, 7, 9-三羧酸, 相对分子质量为330 000, 水溶性, 理化性质稳定, 它广泛分布于G细菌中, 并以非共价键与酶蛋白相结合, 人体组织与体液中也可检出微量PQQ。PQQ在生物体内可发挥多种生物学效应, PQQ可以调节线粒体的数目和功能^[19]、促进细胞增殖^[20], Natio等^[21]用3~30 nmol/L PQQ刺激人成纤维细胞, 结果发现细胞DNA合成增加, 其功效强于成纤维细胞生长因子和胰岛素样生长因子, 与上皮生长因子相当。研究还发现PQQ对神经细胞具有一定的保护作用^[22], 而且它还是动物的重要营养物质, 采用缺乏PQQ的人工合成饲料喂养小鼠时, 其生长、发育将受到损害, 新生动物表现尤为明显。Sox10(SRY同源盒基因10)在许旺细胞的成熟过程中编码重要的转录因子, 许旺细胞早期从前体转化为成熟体的时候均表达Sox10。Sox10在许旺细胞和其他神经脊来源组织中特意地表达, 而且对神经脊细胞的分化特异性非常重要^[23-24]。Sox属于E族Sox分子, 它还包括Sox8和Sox9^[25]。虽然Sox10在很多神经脊细胞中均具重要作用, 但最近的研究表明Sox10是Sox家族中最重要的调节许旺细胞发生的因子^[26-27]。在许旺细胞的发生发展中Sox10可以与多种细胞因子相互作用^[28], 包括Oct6/Scip以及其他因子^[29]。目前研究表明Sox10在许旺细胞髓磷脂基因转录的分子机制中发挥重要作用^[30]。

实验将PQQ作用于许旺细胞, 发现PQQ不仅在形态上对许旺细胞产生影响, 而且对许旺细胞表达早期转录因子Sox10也产生影响。上述结果表明PQQ对许旺细胞有促进增殖的作用, 而且Sox10在这个过程中发挥重要作用, 为PQQ促进许旺细胞增殖机制研究及PQQ用于神经组织工程奠定基础。

4 参考文献

- [1] Zorick TS, Lemke G. Schwann cell differentiation. *J Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(6):870-876.
- [2] Bergey PD, Axel L. Focal hypertrophic cardiomyopathy simulating a mass: MR tagging for correct diagnosis. *AJR Am J Roentgenol.* 2000;174(1):242-244.
- [3] Campana WM. Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav Immun.* 2007;21(5):522-527.
- [4] Lavdas AA, Papastefanaki F, Thomaïdou D, et al. Schwann cell transplantation for CNS repair. *Curr Med Chem.* 2008;15(2):151-160.
- [5] Chernousov MA, Yu WM, Chen ZL, et al. Regulation of Schwann cell function by the extracellular matrix. *Glia.* 2008;56(14):1498-1507.
- [6] Matsushita K, Toyama H, Yamada M, et al. Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;58(1):13-22.
- [7] Liu SQ, Li HY, Peng H, et al. Zhonghua Xianwei Waike Zazhi. 2005; 28(2):145-147.
刘世清, 李皓桓, 彭昊, 等. 吡咯喹啉酮充填导管诱导外周神经再生的实验研究[J]. 中华显微外科杂志, 2005, 28(2): 145-147.
- [8] Li HY, Liu SQ, Peng H, et al. Zhonghua Xianwei Waike Zazhi. 2005;28(3):242-243.
李皓桓, 刘世清, 彭昊, 等. 吡咯喹啉酮对许旺细胞合成与分泌神经生长因子的影响[J]. 中华显微外科杂志, 2005, 28(3): 242-243.

- [9] Liu S, Li H, Ou Yang J, et al. Enhanced rat sciatic nerve regeneration through silicon tubes filled with pyrroloquinoline quinone. *J Microsurgery.* 2005;25(4):329-337.
- [10] Peng H, Zheng HF, Li HY, et al. Zhonghua Shiyan Waike Zazhi. 2008;25(6):728-730.
彭昊, 郑慧锋, 李皓桓, 等. 吡咯喹啉酮对体外培养雪旺细胞增殖及Cyclin E基因表达的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(6): 728-730.
- [11] Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, et al. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 2001;15(1):66-78.
- [12] Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, et al. Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells. *J Biol Chem.* 1998; 273(26):16050-16057.
- [13] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [14] Brockes JP, Fields KP, Raff MC. Studies on cultured rat Schwann cells. Establishment of purified population from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* 1979;165(1):105-118.
- [15] Jin YQ, Liu W, Hong TH, et al. Efficient Schwann cell purification by differential cell detachment using multiplex collagenase treatment. *J Neurosci Methods.* 2008;170(1):140-148.
- [16] Pierucci A, Duek EA, de Oliveira AL. Expression of basal lamina components by Schwann cells cultured on poly (lactic acid) (PLLA) and poly(caprolactone) (PCL) membranes. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(2):489-495.
- [17] Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, et al. Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiol Paris.* 2002;96(1-2):17-24.
- [18] Keyvan FN, Raisman G, Li Y, et al. Delayed repair of corticospinal tract lesions as an assay for the effectiveness of transplantation of Schwann cells. *Glia.* 2005;51(4):306-311.
- [19] Dezawa M. Specific induction of neurons and Schwann cells from bone marrow stromal cells and application to neurodegenerative diseases. *No Shinkei Geka.* 2005;33(7):645-649.
- [20] Stites T, Stroms D, Bauerly K, et al. Pyrroloquinoline quinone modulates mitochondrial quantity and function in mice. *J Nutr.* 2006;136(2):390-396.
- [21] Natio Y, Kumazawa T, Kino I, et al. Effects of pyrroloquinoline quinone (PQQ) and PQQ-oxazole on DNA synthesis of cultured human fibroblasts. *Life Sci.* 1993;52(5):1909-1915.
- [22] Zhu BQ, Zhou HZ, Teerlink JR, et al. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) decreases myocardial infarct size and improves cardiac function in rat models of ischemia and ischemia/reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2004;18(6):421-431.
- [23] Bondurand N, Kobetz A, Pingault V, et al. Expression of the SOX10 gene during human development. *FEBS Lett.* 1998; 432(3):168-172.
- [24] Pusch C, Hustert E, Pfeifer D, et al. The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet.* 1998;103(2):115-123.
- [25] Wegner M, Stolt CC. From stem cells to neurons and glia: A Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* 2005; 28(11):583-588.
- [26] Finsch M, Stolt CC, Lommes P, et al. Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor alpha expression. *Development.* 2008;135(4):637-646.
- [27] Stolt CC, Lommes P, Friedrich RP, et al. Transcription factors Sox8 and Sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte development despite functional redundancy. *Development.* 2004;131(10):2349-2358.
- [28] Wissmuller S, Kosian T, Wolf M, et al. The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(6):1735-1744.
- [29] Ghislain J, Charnay P. Control of myelination in Schwann cells: A Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Rep.* 2006;7(1):52-58.
- [30] Svaren J, Meijer D. The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells. *Glia.* 2008;56(14):1541-1551.

来自本文课题的更多信息--

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30600627)。

利益冲突: 无利益冲突。