

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.19.007

适宜电刺激促进脂肪干细胞向神经方向分化*

柴江涛¹ 杨亚峰² 马 腾² 革 军² 朱 澍² 黄景辉^{2△}

(1 第四军医大学学员旅十队 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究不同强度电刺激对脂肪干细胞(adipose tissue-derived stem cells, ADSC)向神经元方向分化的作用。**方法:**在细胞电刺激室内对 ADSCs 进行电刺激(10Hz, 1h),强度选用五个强度,分别为 0 V/cm、0.5 V/cm、1.0 V/cm、3.0 V/cm、5.0 V/cm;电刺激后,对细胞进行流式凋亡检测及 CCK-8 活性检测,明确不同电刺激对 ADSCs 的影响;同时,应用免疫荧光染色、Western Blotting 评估各组细胞神经特异性标志物 microtubule-associated protein 2 (MAP-2)与 β -tubulin 的表达情况。应用 RT-PCR 检测 MAP-2、 β -tubulin 和 neurofilaments 200(NF-200)的 mRNA 水平,评价不同强度电刺激对 ADSCs 其向神经方向分化的影响。**结果:**1V/cm 的电刺激,未引起明显的细胞凋亡,同时促进了细胞增殖。此外,1V/cm 电刺激后,细胞中的 MAP-2 和 β -tubulin 的免疫荧光染色强度及蛋白含量显著提高;MAP-2、 β -tubulin 和 NF-200 的 mRNA 及蛋白量显著提高。3V/cm 及更高强度的电刺激可导致凋亡细胞数目显著增加。**结论:**强度为 1V/cm 的电刺激可促进脂肪干细胞的增殖,并促进其向神经方向分化,为神经损伤的治疗提供了新的可行方法。

关键词:脂肪干细胞;电刺激;神经分化;增殖

中图分类号:Q683,R-33,R322.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)19-3626-05

Electrical Stimulation Promotes Neural Differentiation of Adipose Tissue-derived Stem Cells*

CHAI Jiang-tao¹, YANG Ya-feng², MA Teng², GE Jun², ZHU Shu², HUANG Jing-hui^{2△}

(1 Team 10, Cadet Brigade, Department of clinical medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role of electrical stimulation (ES) in neuronal differentiation of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs). **Methods:** Cultured ADSCs were exposed to ES (10Hz, 1h) at different intensities (0 V/cm, 0.5 V/cm, 1.0 V/cm, 3.0 V/cm, 5.0 V/cm). The proliferation of cells was characterized by using a CCK-8 assay. The apoptosis of cells after ES was examined by flow cytometry. The expression of MAP-2 and β -tubulin were detected by immunofluorescence staining and Western blotting, and the mRNA levels of MAP-2, β -tubulin and NF-200 were measured by RT-PCR to examine neuronal differentiation of ADSCs. **Results:** ES at 1V/cm was shown to promote cell proliferation without increasing the rate of apoptosis. In addition, the immunofluorescence intensity and protein levels of MAP-2 and β -tubulin were significantly increased compared to sham stimulated cells. Further studies showed that the mRNA levels of MAP-2, β -tubulin and NF-200 were significantly increased by ES at 1 V/cm, while ES at 3V/cm or higher intensities resulted in more cell apoptosis. **Conclusion:** ES at 1 V/cm is able to promote the neuronal differentiation of ADSCs and is beneficial for the proliferation of ADSCs, which highlights the potential application in the treatment of neurodegenerative diseases and neurotrauma in nervous system.

Key words: Adipose tissue-derived stem cells; Electrical stimulation; Neuronal differentiation; Proliferation

Chinese Library Classification: Q683, R-33, R322.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)19-3626-05

前言

神经损伤及神经退行性病变,尤其是中枢神经病变,可造成病灶区域大量神经元凋亡或死亡,被认为是目前临床上治疗的难点^[1,2]。既往尝试多种办法用于治疗此类疾病,但效果均不太理想^[3-5]。目前,干细胞研究的不断深入为中枢神经病变的治

疗带来了新的希望^[6-8]。其中,ADSCs 以其来源丰富、易取材、分化能力强等优点受到越来越多的关注^[9,10]。诱导 ADSCs 向神经元方向分化有望为中枢神经病变的治疗提供新的思路,但现有诱导技术均存在局限性,如细胞毒性或神经分化率低等^[11-13]。因此,寻找一种能够促进脂肪干细胞向神经方向分化的方法,对中枢神经病变的治疗具有重要意义。

* 基金项目:国家重点基础发展规划项目(973 项目)(2014CB542206);国家自然科学基金项目(30973052;81201389)

作者简介:柴江涛(1992-),男,本科,临床医学专业,主要研究方向:脊柱脊髓损伤

△通讯作者:黄景辉,电话:13572066464, E-mail: huangjh@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-02-19 接受日期:2014-03-16)

神经细胞是电兴奋性细胞,对电学信号的刺激非常敏感^[14]。研究发现:电刺激能促进神经分化早期神经轴突的生长^[15]。^[16]近年来,越来越多的研究开始关注电刺激对干细胞分化的影响。研究发现,适宜的电刺激可以促进胚胎干细胞及骨髓间充质干细胞向神经方向分化^[17,18],表明电刺激在干细胞的分化过程中扮演重要角色。新近研究发现,低频交流电可升高脂肪干细胞胞浆内钙离子浓度^[19],表明脂肪干细胞也能对电刺激进行响应,但电刺激对脂肪干细胞向神经方向分化的作用还未见研究。因此,本实验拟探讨电刺激对脂肪干细胞向神经元方向分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

3-4周健康 Sprague Dawley 大鼠(由第四军医大学实验动物中心提供),细胞培养基 DMEM/F12 (Gibco, 美国),一型胶原酶(Sigma-Aldrich, 美国),PBS,胎牛血清(Gibco, 美国),CCK-8 试剂盒,兔抗大鼠 MAP-2 抗体(Sigma-Aldrich, 美国),小鼠抗大鼠 β -tubulin 抗体(Sigma-Aldrich, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 脂肪干细胞的分离、培养及鉴定 取3周龄的SD大鼠2只,颈椎脱臼处死,75%的酒精浸泡8min;无菌条件下取出腹股沟部皮下脂肪,PBS冲洗,充分剪碎后,于1%一型胶原酶中振荡消化30-40min;等量DMEM/DF12培养基(含10%胎牛血清)终止消化,1200 r/min离心8min后弃上清;用含10%胎牛血清的DMEM/DF12培养基重悬细胞,以 1×10^5 个/cm²接种于25cm²培养瓶,37℃、5%CO₂条件下培养。隔天换液,细胞铺满至培养瓶底约80%、接近融合状态时,用0.25%胰酶/0.02% EDTA消化、传代,每6-7天传代1次,第3代至第5代细胞用于本研究。

1.2.2 细胞凋亡情况检测 在细胞电刺激模型中,对培养的ADSCs细胞进行电刺激1h,刺激强度分别为0V/cm、0.5V/cm、1.0V/cm、3.0V/cm、5.0V/cm,刺激频率为10Hz,继续培养24h用于进行细胞凋亡检测。用0.25%的胰酶将细胞消化并制成细胞悬液,2000 rpm离心5min,弃上清,用PBS洗涤细胞两次,将细胞重悬于200 μ L标记缓冲液,加入10 μ L Annexin V-FITC,轻轻混匀,避光室温反应15min,加入300 μ L标记缓冲液,结合使用碘化丙啶(PI)拒染法,采用流式细胞仪检测分析细胞凋亡的百分率。

1.2.3 细胞增殖能力检测 对ADSCs进行电刺激的方法同上,电刺激后24h、48h、72h,以0.25%胰酶消化刺激后的ADSCs,制备单细胞悬液,以 1×10^4 个/孔的细胞密度接种于96孔培养板中,分别于各孔内加入10 μ L CCK-8试剂,震荡均匀后置于培养箱内培养,4h后用酶标仪于492nm波长处检测各自吸光度值,计算各组细胞增殖能力。

1.2.4 免疫荧光染色 电刺激后24h,4%多聚甲醛溶液(paraformaldehyde, PFA)固定细胞20分钟;PBS溶液清洗三遍后,10%山羊血清封闭30min;加入一抗小鼠抗大鼠 β -tubulin (1:200),兔抗大鼠 MAP-2(1:200),4℃孵育过夜;第二天室温下复温一小时,洗片后加入山羊抗兔-TRITC和山羊抗小鼠-FITC(1:100),室温下孵育1h,清洗后进行DAPI(1:500)染核

,5min后PBS溶液清洗;甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.2.5 RT-PCR 检测 电刺激后24h,分别提取各组细胞总RNA,按照逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA。MAP-2上游引物5' AGCCTGCAGCTCTGCCTTA 3',下游引物5' CTTCAGTGCAGCTGTTTGTTC 3',扩增片段长度为382bp; β -tubulin上游引物5' CACACCCGC-CACCAGTTCGCA 3',下游引物5' GCGGACTGTTACT-GAGCTGCG 3',扩增片段长度为278bp;NF200上游引物5' CAGAGTACGCTGCAGTCAGAGG 3',下游引物5' CTCTTGGGACAGAGCGCATAG 3'采用SYBR Premix Ex Taq™试剂盒,按照说明书进行荧光定量PCR反应。反应体系为20,反应条件为:95℃预变性2.5min,40次循环内:95℃变性35s,59℃退火30s,65℃延伸5s,反应结束后进行扩增曲线和溶解曲线的分析。

1.2.6 Western blotting 检测 电刺激后24h,提取各电刺激组蛋白后,加入等量的loading buffer,振荡混匀,100℃煮沸5min,离心后依次在梳孔中加入蛋白样品,110V电泳至胶下缘。取胶、转膜、并将PVDF膜置于5%脱脂牛奶的封闭液中室温封闭2h。洗膜3次,加入一抗MAP-2, β -tubulin(1:1000)。洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育1h,洗膜并用辣根过氧化物酶-DAB法染色。当出现明显的棕色蛋白条带后用三蒸水停止染色。用灰度仪扫描棕色蛋白条带。

1.3 统计学处理

应用SPSS 15.0软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准误差表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同强度电刺激对ADSCs活力的影响

电刺激后24h、48h、72h,取各组细胞进行细胞增殖能力检测。与对照组相比,刺激后24h、48h、96h,1V/cm组的CCK-8值分别增加了32.1%、35.2%、18.2%,3V/cm组的CCK-8值分别下降了57.2%、70.6%、86.4%,5V/cm组的CCK-8值分别下降了78.6%、88.2%、91.8%(图1),0.5V组和对照组无显著差异。

2.2 不同强度电刺激对ADSCs凋亡的影响

采用Annexin-V和PI双染法分别检测各组细胞的凋亡情况,如图2所示:对照组凋亡率为 $1.34 \pm 1.13\%$;0.5V/cm组凋亡率为 $2.63 \pm 1.24\%$;1V/cm组凋亡率为 $2.71 \pm 1.52\%$;3V/cm组凋亡率为 $60.92 \pm 7.93\%$;5V/cm组凋亡率为 $84.71 \pm 11.20\%$ 。上述结果说明,3V/cm及更高强度电刺激会引起ADSCs凋亡。

2.3 电刺激对脂肪干细胞神经分化的作用

对各电刺激组进行MAP-2及 β -tubulin免疫荧光双标检测。如图3A所示,对照组中,MAP-2和 β -tubulin表达阴性。0.5V/cm及1V/cm电刺激后,细胞内MAP-2和 β -tubulin的表达呈中、强阳性。其中0.5V/cm组MAP-2阳性细胞率为 $10.10 \pm 2.58\%$ ($P < 0.01$ vs 对照组), β -tubulin的阳性细胞率为 $12.23 \pm 2.69\%$ ($P < 0.01$ vs 对照组);1V/cm电刺激组MAP-2的阳性细胞率为 $22.13 \pm 2.81\%$ ($P < 0.01$ vs 对照组), β -tubulin的阳性率为 $26.04 \pm 3.20\%$ ($P < 0.01$ vs 对照组);当电刺激强度为3V/cm和5V/cm时,细胞凋亡大于60%,为保证统计结果准确性,未进行细胞免疫荧光检测。

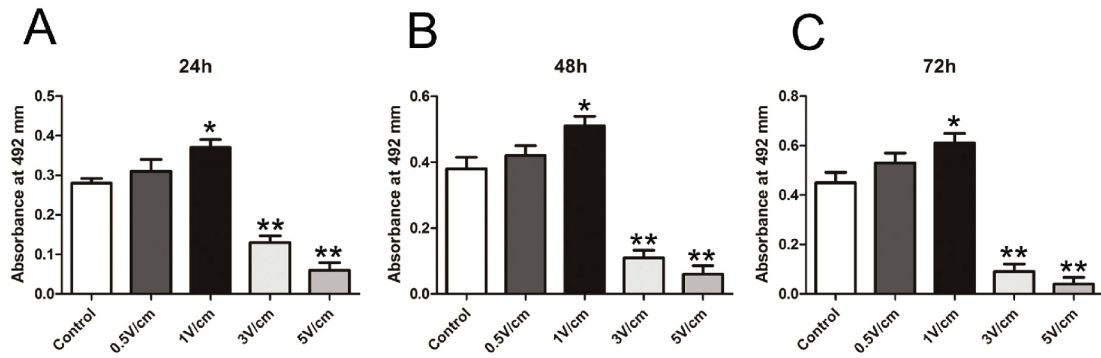


图1 各组 CCK-8 吸光度值: (A) 24h; (B) 48h; (C) 72h. (* $P < 0.05$ vs Control 组; ** $P < 0.01$ vs Control 组)

Fig. 1 The CCK-8 assay after ES (A) the CCK-8 values in 24h; (B) the CCK-8 values in 48h; (C) the CCK-8 values in 72h. Values shown are mean $\pm$ SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA when compared with control group

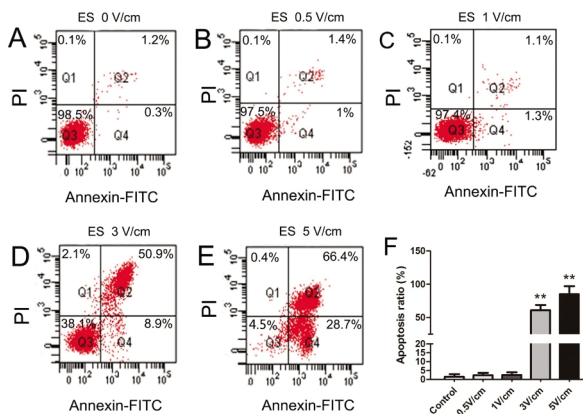


图2 各组细胞流式凋亡检测: (A) 对照组. (B) 0.5 V/cm. (C) 1 V/cm. (D)

3 V/cm. (E) 5 V/cm. (F) 各组凋亡率统计图 (** $P < 0.01$ vs Control 组)

Fig. 2 Apoptosis analysis by flow cytometry: (A) Control. (B) 0.5 V/cm. (C) 1 V/cm. (D) 3 V/cm. (E) 5 V/cm. (F) The percentage of apoptotic cells in each group was obtained by averaging the results of four flow cytometry assays in each group

应用 RT-PCR 方法检测电刺激后各组细胞神经特异性标记基因 MAP-2、 β -tubulin 及 NF200 的基因表达情况。与对照组相比, 1V/cm 电刺激组的 MAP-2、 β -tubulin、NF200 mRNA 水平显著上升, 分别上升了 4.72 倍 ($P < 0.01$ vs 对照组, 图 4A)、6.12 倍 ($P < 0.01$ vs 对照组, 图 4B)、3.02 倍 ($P < 0.01$ vs 对照组,

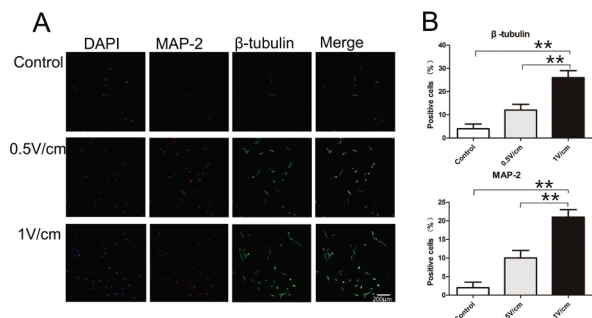


图3 不同强度的电刺激对 ADSCs 神经样分化的影响。 (A) 激光共聚焦显微镜下标记有神经特异性标志物的 ADSCs。其中, TRITC 标记 MAP-2, FITC 标记 β -tubulin; 应用 DAPI 标记细胞核。 (B) 阳性细胞计数统计图 (** $P < 0.01$)

Fig. 3 The effect of different intensities of ES on neuronal differentiation of ADSCs. (A) Localization of neurogenic markers in ADSCs by confocal microscopy. TRITC labeled MAP-2 and FITC labeled β -tubulin were used for immunohistological analysis. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar = 200 μ m. (B) The neural marker positive cells were counted

图 4C)。0.5 V/cm 电刺激组仅 β -tubulin mRNA 表达显著高于对照组 ($P < 0.01$ vs 对照组, 图 4B), MAP-2 及 NF200 mRNA 表达水平与对照组无统计学差异 (图 4A, C)。3 V/cm 电刺激组 β -tubulin、MAP-2 及 NF200 mRNA 表达水平与对照组均无统计学差异 (图 4)。

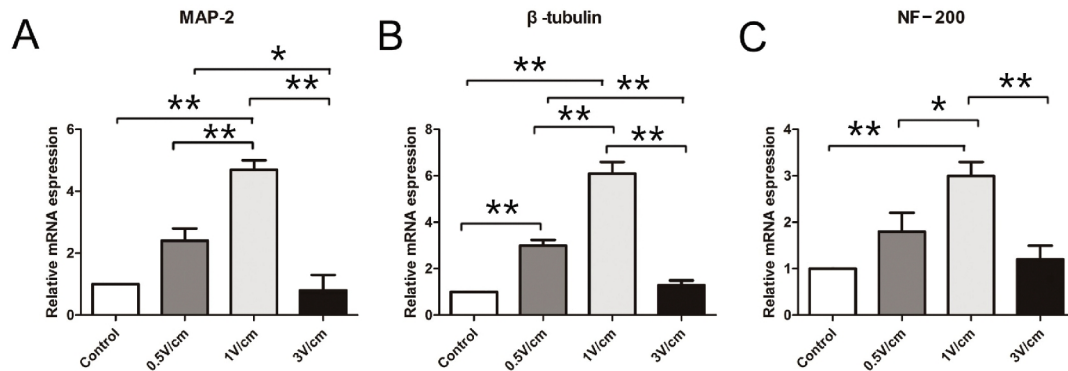


图4 各组 MAP-2、NF-200、 β -tubulin 的 mRNA 水平 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig. 4 The mRNA levels of MAP-2, NF-200 and β -tubulin in the control group, 0.5 V/cm group, 1 V/cm group and 3 V/cm group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

应用 western blotting 方法检测电刺激后各组细胞神经特异性标记分子 MAP-2 和 β -tubulin 的蛋白表达情况。1 V/cm 电刺激组细胞 MAP-2 和 β -tubulin 表达均显著增加,与对照组相比,1 V/cm 组的 MAP-2 和 β -tubulin 蛋白含量分别上升了 4.38 倍($P<0.01$ vs 对照组,图 5A)和 2.63 倍($P<0.01$ vs 对照组,图 5B)。0.5 V/cm 及 3 V/cm 电刺激组 β -tubulin、MAP-2 及 NF200 mRNA 表达水平与对照组均无统计学差异(图 5)。

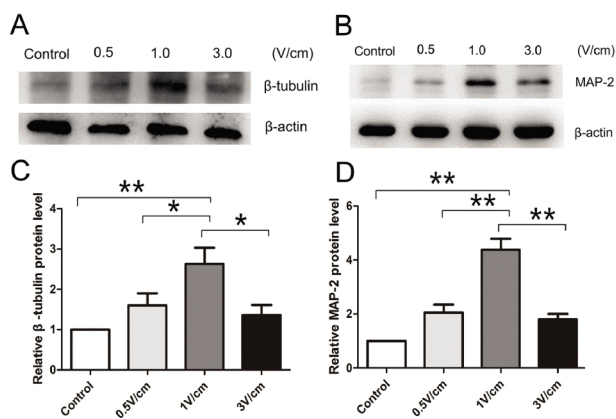


图 5 (A, B) 各组 MAP-2 和 β -tubulin 的蛋白表达水平(C, D)

MAP-2 和 β -tubulin 蛋白表达水平统计图; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Fig. 5 The protein levels of MAP-2 and β -tubulin were determined for the control group, 0.5 V/cm, 1 V/cm and 3 V/cm groups (A, B). The ratio of protein levels was shown (C, D); * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

中枢神经再生是目前临床治疗的难点之一。近年来,随着干细胞研究的迅猛发展,以干细胞为载体的再生医学治疗技术被广泛应用于神经损伤及神经退行性病变的治疗之中。干细胞向神经元方向分化比例低,限制了其在中枢神经再生中的应用。本文主要研究了电刺激对 ADSCs 向神经元方向分化的影响。我们应用不同的电刺激强度刺激培养的 ADSCs,发现强度为 1 V/cm 可促进脂肪干细胞,且不引起细胞凋亡,而强度大于 3 V/cm 的电刺激会导致细胞凋亡明显增加。免疫荧光染色发现:1 V/cm 的电刺激可显著提高 MAP-2、 β -tubulin 阳性细胞的比例,同时促进 MAP-2、 β -tubulin、NF200 的表达,说明 1 V/cm 的电刺激不仅可以促进 ADSCs 的增殖,同时促进 ADSCs 向神经元方向分化,为 ADSCs 在神经损伤和神经退行性病变中的应用提供了新的思路。

中枢神经损伤后神经元不能再生,因此,如何能够修复受损的中枢神经病变区域一直没有得到很好的解决。鉴于干细胞具有多向分化的能力,因此,多种干细胞,如胚胎干细胞,神经干细胞,骨髓干细胞等被尝试应用于这些疾病的治疗中。相比其他干细胞,ADSCs 具有来源广泛,易获得,高分化潜能等特点^[9]。迄今为止,很多方法如神经营养因子诱导、化学诱导、基因转染等方法均被证实具有一定程度促进 ADSCs 向神经元分化的作用^[10],但这些方法均有其局限性,如分化比例低、对细胞产生不良影响等,限制了脂肪干细胞在中枢神经再生中的应用,因此寻找一种对细胞损伤较小,又能促进脂肪干细胞向神经方向分化的技术成为新的研究热点。

神经元细胞具有电兴奋性,对外界电刺激极为敏感^[14]。外源性电刺激不仅能够促进轴突生长,并且还可引导轴突伸展方向^[15]。在前期的研究中,我们还发现不同强度的电刺激能促进雪旺细胞和嗅鞘细胞的增殖,增强其分泌功能^[20,21],对周围神经损伤的治疗具有重要意义。此外,外源性电刺激还可以促进胚胎干细胞和骨髓干细胞向神经元方向分化^[17],说明电信号在干细胞向神经元方向分化的过程中同样具有重要作用,但电刺激对 ADSCs 的作用尚未见相关研究报道。在本研究中,我们首次尝试应用电刺激来干预 ADSCs 的分化,发现 1 V/cm (10 Hz, 1h) 的电刺激可以促进细胞内 MAP-2、 β -tubulin 和 NF-200 的表达,同时不增加细胞的凋亡;而高于 1 V/cm 的电刺激会促进细胞凋亡。说明适宜强度,如本研究中的 1 V/cm (10Hz, 1h),具有促进 ADSCs 向神经元方向分化的能力。除刺激强度外,刺激频率、刺激时间、电刺激形式(脉冲、正弦波、方波、直流电等)均可能影响电刺激对 ADSCs 的作用,需要在以后的研究中对上述问题进行详细的研究和论证,以便明确最利于 ADSCs 向神经元方向分化的电刺激参数,用于神经再生相关研究。

通过本研究,我们电刺激可促进脂肪干细胞向神经元方向分化,为脂肪干细胞用于神经损伤和神经退行性病变的治疗提供了新思路和新方法。

参考文献 (References)

- [1] Licker V, Kovari E, Hochstrasser D F, et al. Proteomics in human Parkinson's disease research[J]. J Proteomics, 2009, 73(1): 10-29
- [2] Waldmeier P C, Tatton W G. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy [J]. Drug Discov Today, 2004, 9(5): 210-218
- [3] Lim S T, Airavaara M, Harvey B K. Viral vectors for neurotrophic factor delivery: a gene therapy approach for neurodegenerative diseases of the CNS[J]. Pharmacol Res, 2010, 61(1): 14-26
- [4] Strutt A M, Lai E C, Jankovic J, et al. Five-year follow-up of unilateral posteroventral pallidotomy in Parkinson's disease [J]. Surg Neurol, 2009, 71(5): 551-558
- [5] Lu L, Zhao C, Liu Y, et al. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease [J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2005, 15(1): 46-51
- [6] Shihabuddin L S, Aubert I. Stem cell transplantation for neurometabolic and neurodegenerative diseases [J]. Neuropharmacology, 2010, 58(6): 845-854
- [7] Gao A, Peng Y, Deng Y, et al. Potential therapeutic applications of differentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs) in the treatment of neurodegenerative diseases[J]. Neuroscience, 2013, 228: 47-59
- [8] Sugaya K. Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases[J]. Int Rev Cytol, 2003, 228: 1-30
- [9] Zhang H T, Liu Z L, Yao X Q, et al. Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study[J]. Cytotherapy, 2012, 14(10): 1203-1214
- [10] Taha M F, Hedayati V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells [J]. Tissue Cell, 2010, 42(4): 211-216
- [11] Ahmadi N, Razavi S, Kazemi M, et al. Stability of neural differentiation in human adipose derived stem cells by two induction protocols[J]. Tissue Cell, 2012, 44(2): 87-94

- [12] Ning H, Huang Y C, Banie L, et al. MicroRNA regulation of neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stem cells [J]. Differentiation, 2009, 78(5): 253-259
- [13] Abdanipour A, Tiraihi T. Induction of adipose-derived stem cell into motoneuron-like cells using selegiline as preinducer [J]. Brain Res, 2012, 1440: 23-33
- [14] Saygili E, Schauerte P, Kuppers F, et al. Electrical stimulation of sympathetic neurons induces autocrine/paracrine effects of NGF mediated by TrkA[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 49(1): 79-87
- [15] Ou Y T, Lu M S, Chiao C C. The effects of electrical stimulation on neurite outgrowth of goldfish retinal explants [J]. Brain Res, 2012, 1480: 22-29
- [16] Chang Y J, Hsu C M, Lin C H, et al. Electrical stimulation promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth and signaling [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(8): 4130-4136
- [17] Park J S, Yang H N, Woo D G, et al. Exogenous Nurr1 gene expression in electrically-stimulated human MSCs and the induction of neurogenesis[J]. Biomaterials, 2012, 33(29): 7300-7308
- [18] Yamada M, Tanemura K, Okada S, et al. Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2007, 25(3): 562-570
- [19] 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 [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010, 16(6): 1377-1386
- [20] Huang J, Lu L, Zhang J, et al. Electrical stimulation to conductive scaffold promotes axonal regeneration and remyelination in a rat model of large nerve defect[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39526
- [21] Qi F, Wang Y, Ma T, et al. Electrical regulation of olfactory ensheathing cells using conductive polypyrrole/chitosan polymers[J]. Biomaterials, 2013, 34(7): 1799-1809

(上接第 3621 页)

- [10] Carrington P E, Sandu C, Wei Y, et al. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-2[J]. Mol Cell, 2006, 22(5): 599
- [11] Mhaidat NM, Wang Y, Kiejda KA, et al. Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2 [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(2): 752-761
- [12] Bafaloukos D, Aravantinos G, Fountzilias G, et al. Docetaxel in combination with dacarbazine in patients with advanced melanoma [J]. Oncology, 2002, 63(4): 333-337
- [13] Fruehauf JP, Kong KM, Jakowatz JG. Docetaxel and vinorelbine plus GM-CSF in malignant melanoma[J]. Oncology (Williston Park), 2005, 19(42): 19-22
- [14] Sanlioglu AD, Dirice E, Elpek O, et al. High TRAIL death receptor 4 and decoy receptor 2 expression correlates with significant cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma patients [J]. Pancreas, 2009, 38(2): 154-160
- [15] Kurbanov BM, Fecker LF, Geilen CC. Resistance of melanoma cells to TRAIL does not result from upregulation of antiapoptotic proteins by NF-kappaB but is related to downregulation of initiator caspases and DR4[J]. Oncogene, 2007, 26(23): 3364-3377
- [16] Frank B, Hemminki K, Shanmugam KS, et al. Association of death receptor 4 haplotype 626C-683C with an increased breast cancer risk [J]. Carcinogenesis, 2005, 26(11): 1975-1977
- [17] Wolf S, Mertens D, Pscherer A, et al. Ala228 variant of trail receptor 1 affecting the ligand binding site is associated with chronic lymphocytic leukemia, mantle cell lymphoma, prostate cancer, head and neck squamous cell carcinoma and bladder cancer [J]. Int J Cancer, 2006, 118(7): 1831-1835
- [18] Kuraoka K, Matsumura S, Sanada Y, et al. A single nucleotide polymorphism in the extracellular domain of TRAIL receptor DR4 at nucleotide 626 in gastric cancer patients in Japan [J]. Oncol Rep, 2005, 14(2): 465-470
- [17] Stuckey DW, Shah K, TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy[J]. Trends Mol Med, 2013, 26(13): 154-158
- [18] Lee DH, Lee CS, Kim DW, et al. Digitoxin sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by upregulation of death receptor 5 and downregulation of survivin[J]. Anticancer Drugs, 2013, 16
- [19] 毛淑华, 于水静, 晏菊芳, 等. 5-Fu 与 TRAIL 联用抗结肠癌细胞株 HT-29 效应的实验研究[J]. 华西药理学杂志, 2010, 25(5): 564-566
- Mao Shu-hua, Yu Shui-jing, Yan Ju-fang, et al. Synergistic antitumor effect of TRAIL and 5-Fu on the colon carcinoma cell line HT-29 [J]. West china journal of pharmaceutical sciences, 2010, 5(5): 564-566
- [20] Krut FA. TRAIL and cancer therapy [J]. Can Lett, 2008, 263(1): 14-25
- [21] Cotter T G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(7): 501-507
- [22] Yoo J, Park SS, Lee YJ. Pretreatment of docetaxel enhances TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells [J]. Cell Biochem, 2008, 104(5): 1636-1646