

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2020.01.015

细胞膜去极化通过激活 MAPK 信号通路 促进原代肌母细胞增殖

郑丽蓉, 许艳华, 曾卫卫, 陈宇琛, 范春娥, 陈华群

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 细胞膜去极化可促进某些细胞包括肌卫星细胞的增殖, 但去极化对于肌母细胞的作用还不清楚. 本文通过培养基中高浓度的钾离子(K^+)引发小鼠原代肌母细胞膜的去极化, 采用直接计数法评估细胞的增殖能力. 结果显示, 在 K^+ 浓度为 25 mmol/L 的培养基中培养 24 h 后, 肌母细胞数量较常规培养基(5 mmol/L K^+)明显增加, 但 K^+ 高至 50 mmol/L 和 100 mmol/L 时对细胞增殖没有促进作用. 通过流式细胞技术进行细胞周期分析显示, 25 mmol/L K^+ 处理使 G1 期的细胞数量减少, S 期的细胞数量增加. 免疫荧光染色和 Western blot 研究发现, 25 mmol/L K^+ 处理后, 对肌母细胞的肌分化能力没有影响. 进一步研究发现, 25 mmol/L K^+ 明显促进了肌母细胞 MAPK 信号通路(ERK1/2)的激活, 并与其促进细胞增殖的效应相关. MEK1/ERK1/2 的两种抑制剂 U0126 和 PD98059 均可减弱细胞膜去极化引起的细胞增殖促进效应. 综上, 研究结果表明细胞膜去极化通过激活 MAPK 通路促进小鼠原代肌母细胞的增殖.

[关键词] 去极化, 肌母细胞, 细胞增殖, MAPK 信号通路

[中图分类号] Q291 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2020)01-0100-07

Plasma Membrane Depolarization Promotes Primary Myoblast Proliferation Through Activation of MAPK Signaling Pathway

Zheng Lirong, Xu Yanhua, Zeng Weiwei, Chen Yuchen, Fan Chun'e, Chen Huaqun

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: Plasma membrane (PM) depolarization can enhance the proliferation of certain types of cells including satellite cell. However, the effects of PM depolarization on the proliferation of myoblast have not been determined. In this study, it was investigated the effects of PM depolarization via high concentration of extracellular potassium ion (K^+) on the proliferation of murine primary myoblasts. By direct cell counting, it was shown an apparent increase in the number of cells cultured in medium containing 25 mmol/L K^+ compared with that of regular medium(5 mmol/L K^+). However, excessively higher(50 mmol/L and 100 mmol/L) concentrations of K^+ did not promote the growth of myoblasts. In addition, a decrease in the number of cells undergoing G1 phase and an increase in that of S phase was detected by FACS technology. Immunostaining and Western blot analysis showed that the myogenic differentiation potential was not altered after PM depolarization treatment. Furthermore, it was found that the basal level of activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) was enhanced with PM depolarization treatment. Both U0126 and PD98059, the MEK1/ERK1/2 inhibitors, obviously attenuated the proliferation enhancement of the cells. Taken together, our data indicate that PM depolarization promotes the proliferation of primary myoblasts through activation of MAPK/ERK1/2 pathway.

Key words: depolarization, primary myoblast, proliferation, MAPK signaling pathway

细胞跨膜电位是指细胞双层膜上的电压差, 其通过细胞内外离子主要是钾离子(K^+)的浓度差建立. 现已发现, 细胞的膜电位水平与细胞的增殖和分化密切相关. 通常动物细胞分裂时细胞膜处于去极化

收稿日期: 2019-04-04.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371356)、江苏省教育厅重大项目(13KJA180004).

通讯作者: 陈华群, 教授, 研究方向: 细胞生物学. E-mail: chenhuaqun@njnu.edu.cn

状态,而分化时则相反^[1-3]。细胞膜的极化状态还与某些生理病理过程相关。早在 20 世纪 60 年代早期,就有研究发现细胞在恶性转化期间发生膜的去极化^[4]。后续的研究进一步发现,通过持续的去极化可以诱导成熟的神经元细胞重新进入细胞周期^[5]。越来越多的研究表明,膜电位对细胞的生物学功能起着至关重要的调节作用^[6-7]。

骨骼肌发育涉及复杂的细胞生物学过程,主要包括肌肉前体细胞的增殖、肌分化及肌管的形成和成熟等^[8]。因此肌肉前体细胞的膜电位改变与细胞增殖和分化是否具有相关性,越来越受到人们关注。有研究发现,肌母细胞系 C2C12 在体外诱导分化过程中,细胞的膜电位明显的升高,细胞膜呈极化状态^[2]。对成体肌肉干细胞-肌卫星细胞的研究也发现,去极化可促进细胞的增殖,并维持细胞 Pax7 的表达水平,不改变细胞干性^[9]。肌母细胞作为一种肌肉前体细胞,存在于新生动物的肌肉中,可分裂增殖并分化为肌肉细胞,形成肌纤维^[10]。原代肌母细胞也被用于细胞移植治疗肌肉相关疾病^[11-12]。

肌母细胞的增殖水平对于肌肉的发育和肌肉移植治疗相关的疾病具有重要意义。目前发现,利用低氧条件和在细胞生长环境中加入生长因子等可促进肌母细胞的增殖^[13-14]。本文通过增加细胞外培养基中的 K^+ 浓度研究去极化对于小鼠原代肌母细胞增殖的作用,并初步探究了其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

新生雄性 C57BL/6J (B6) 小鼠购自南京大学-南京生物医药研究院。

1.1.2 实验试剂

蛋白 Marker 购自 Thermo 公司;CaCl₂、大鼠鼠尾胶原、DAPI 染液购自 Sigma 公司;bFGF 购自 R&D 公司;F10 基础培养基、DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)、青/链霉素、马血清、胰蛋白酶、抗荧光淬灭封片液购自 Gibco 公司;4%多聚甲醛、Tritonx-100、Tween-20 购自 Biosharp 公司;II 型分散酶(Dispase type II)和 D 型胶原酶(Collagenase D)购自 Roche 公司;PVDF 膜购自 Millipore 公司;ECL 显影液购自 Bio-Rad 公司;即用型正常山羊血清(NGS)购自武汉博士德生物有限公司;不含 KCl 和 NaCl 成分的 F10 基础培养基定制于南京三生生物技术有限公司;含碘化丙锭和核糖核酸酶 A 的测细胞周期试剂盒购自南京凯基生物有限公司。

抗 Phospho-p44/42 MAPK (p-ERK1/2) (Thr202/Tyr204) 兔抗和抗 p44/42 MAPK (p-ERK1/2) 兔抗购自 CST 公司;MF20 购自 DSH;抗 GAPDH 鼠抗购自 Abcam 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠二抗和 HRP 标记山羊抗兔二抗购自 Jackson 公司;Alexa Fluor 488 荧光标记山羊抗兔和 Alexa Fluor 555 荧光标记山羊抗鼠二抗购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 试剂配制

细胞生长培养基(Growth medium, GM):在 F10 基础培养基中加入 FBS 使终浓度为 20%,再加入青/链霉素使终浓度为 1%,以及 5 ng/mL bFGF,置 4 °C 备用。

分化培养基(Differentiation medium, DM):在 DMEM 高糖培养基中加入马血清至 2%,青/链霉素浓度 1%,4 °C 备用。

4 mol/L NaCl 和 4 mol/L KCl 储存液按常规方法配制,高压灭菌后备用。

1.2 实验方法

1.2.1 原代肌母细胞的培养及细胞传代

参照文献^[15]并经本实验室优化,具体如下:分离新生小鼠后肢肌肉,用含 2 倍青/链霉素的 PBS 清洗 3 次,尽可能将脂肪和结缔组织去除干净,将肌肉剪碎。然后,用 D 型胶原酶、II 型分散酶和 CaCl₂ (1 mol/L) 的酶混合液(按 20:20:1 的比例混合)37 °C 消化约 30 min。加入 DMEM 培养基终止消化并重悬消化物,以 1 000 rpm 离心 10 min。细胞沉淀重悬于 DMEM 完全培养基,吸打混匀后接种于 10 cm 直径的细胞培养皿。37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h 去除贴壁的成纤维细胞,吸取未贴壁的细胞(肌母细胞)离心后用含 20% FBS 的 F10 生长培养基重悬,于预先铺有胶原的 24 孔板中培养。本方法分离培养的肌母细胞经过 Desmin 染色鉴定纯度在 90% 以上。

1.2.2 细胞膜的去极化处理

本文通过在定制无 KCl、无 NaCl F10 基础培养基中加入不同体积的 NaCl 和 KCl 储存液配制含 25 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L 不同 K⁺ 浓度的培养基,并使培养基的最终 NaCl+KCl 浓度相同,与 Gibco 公司的一致。如上所述培养的肌母细胞培养于 24 孔板,细胞贴壁后,吸去原培养基,加入含有不同 K⁺ 浓度的 GM,继续培养,用于本文的实验研究。

1.2.3 细胞增殖测定-直接细胞计数法

24 孔板每孔接种约 4×10^4 个细胞,在含不同浓度 K⁺ 的 GM 中培养 24 h 和 48 h,细胞消化后重悬于 DMEM 基础培养基中,显微镜下血球计数板计数。为了评估细胞膜去极化诱导的 ERK1/2 激活对细胞增殖活性的影响,用 5 μ mol/L、10 μ mol/L 和 20 μ mol/L 等不同剂量的 MEK1 抑制剂 U0126 或 PD98059 处理细胞,并在指定时间收获细胞计数。

1.2.4 细胞周期分析

将细胞以 5 000 个细胞/cm² 的密度接种于 6 孔板,细胞贴壁后在含不同浓度 K⁺ 的 GM 中继续培养 24 h,收获细胞。PBS 洗涤细胞后,用冷的 75%乙醇固定 2 h 以上。细胞经 PBS 洗涤后用含有核糖核酸酶 A 的碘化丙啶(PI)避光染色 60 min。FACS Calibur(BD)流式系统进行分析。根据 FL2-W 通道,用适当的门计数每个样品总共 10 000 个事件以排除细胞聚集体和碎片,FlowJo 软件进行细胞周期分析。

1.2.5 Western blot 分析

细胞裂解液常规离心后取上清进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白条带转移至 PVDF 膜。PVDF 膜用含 5%脱脂奶粉的 TBS 室温封闭 1 h,以相应抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,第 2 d 室温孵育二抗 1 h。ECL 化学发光显色、拍照并通过 ImageJ 软件对条带进行灰度分析。

1.2.6 免疫荧光染色

收取细胞,4%多聚甲醛室温固定 15 min,用含 0.5% TritonX-100 的 TBS 室温透化 15 min,5% NGS 室温封闭 1 h。一抗 4 $^{\circ}$ C 湿盒孵育过夜,第 2 d 用荧光二抗室温孵育 1 h,然后加入 DAPI 再孵育 15 min。抗荧光淬灭剂封片,激光共聚焦显微镜(Nikon A1-TIRF)观察并拍照。

1.2.7 原代肌母细胞诱导分化

肌母细胞生长达到 80%~90%密度后,吸弃 GM,换入含 2%马血清的 DM,每 2 d 换液一次,并在指定的时间收获细胞。

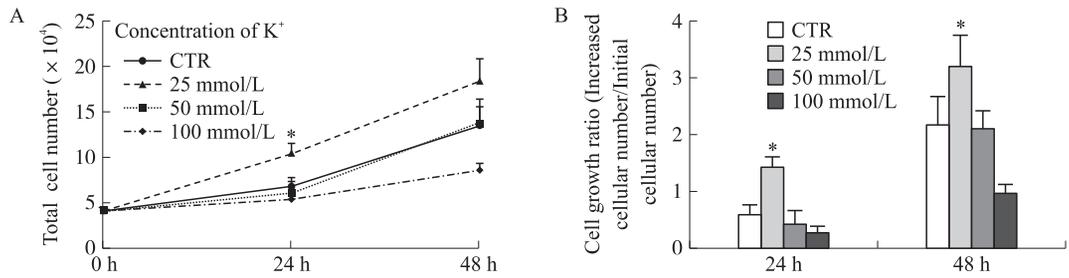
1.2.8 统计分析

使用 GraphPad Prism 7.0 和 PhotoShop 软件进行数据统计分析。本实验中所选取的动物样本数均 ≥ 3 ,实验结果表示为至少 3 次独立实验的(平均值 \pm SEM)。通过 Student's *t* 检验评估两组数据间的统计学显著性。 $P < 0.05$ 表明两个样本间有显著差异,表示为 * ; $P < 0.01$ 表明有很显著差异,表示为 ** ; $P < 0.001$ 说明有极其显著差异,表示为 ***。

2 结果与讨论

2.1 细胞膜去极化促进小鼠原代肌母细胞的增殖

常规细胞培养基中含 K⁺ 浓度约为 5 mmol/L,通常动物细胞内 K⁺ 浓度高于细胞外,K⁺ 外流以维持细胞的静息膜电位。而细胞外 K⁺ 浓度高于 5 mmol/L 时,则 K⁺ 外流被抑制,使细胞质膜处于去极化状态。文献中通常以 10 mmol/L~100 mmol/L K⁺ 处理形成细胞膜的去极化^[9,16]。本文以含 K⁺ 浓度为 5 mmol/L(对照组,CTR)、25 mmol/L、50 mmol/L 和 100 mmol/L 的 GM 培养细胞,在培养后 24 h 和 48 h 后收集细胞计数。结果发现(图 1),24 h 和 48 h 后,25 mmol/L K⁺ 浓度组细胞数量都明显高于对照(24 h: $10.5 \pm 1.02 \times 10^4$ vs $6.81 \pm 0.91 \times 10^4$, $P < 0.05$; 48 h: $18 \pm 2.26 \times 10^4$ vs $13.1 \pm 2.8 \times 10^4$),与增殖比率(细胞增加的数量相对于接种时的细胞数量)的结果一致(24 h: 1.42 ± 0.18 vs 0.58 ± 0.19 , $P < 0.05$; 48 h: 3.20 ± 0.55 vs 2.03 ± 0.62 , $P < 0.05$)。但当 K⁺ 浓度高至 50 mmol/L 和 100 mmol/L 时,对细胞生长无显著促进作用,反被抑制,结果如图 1 所示。以上研究表明,细胞外高浓度 K⁺ 形成的细胞膜去极化可明显促进小鼠原代肌母细胞的增殖,但过高浓度的 K⁺ 则显示抑制作用。



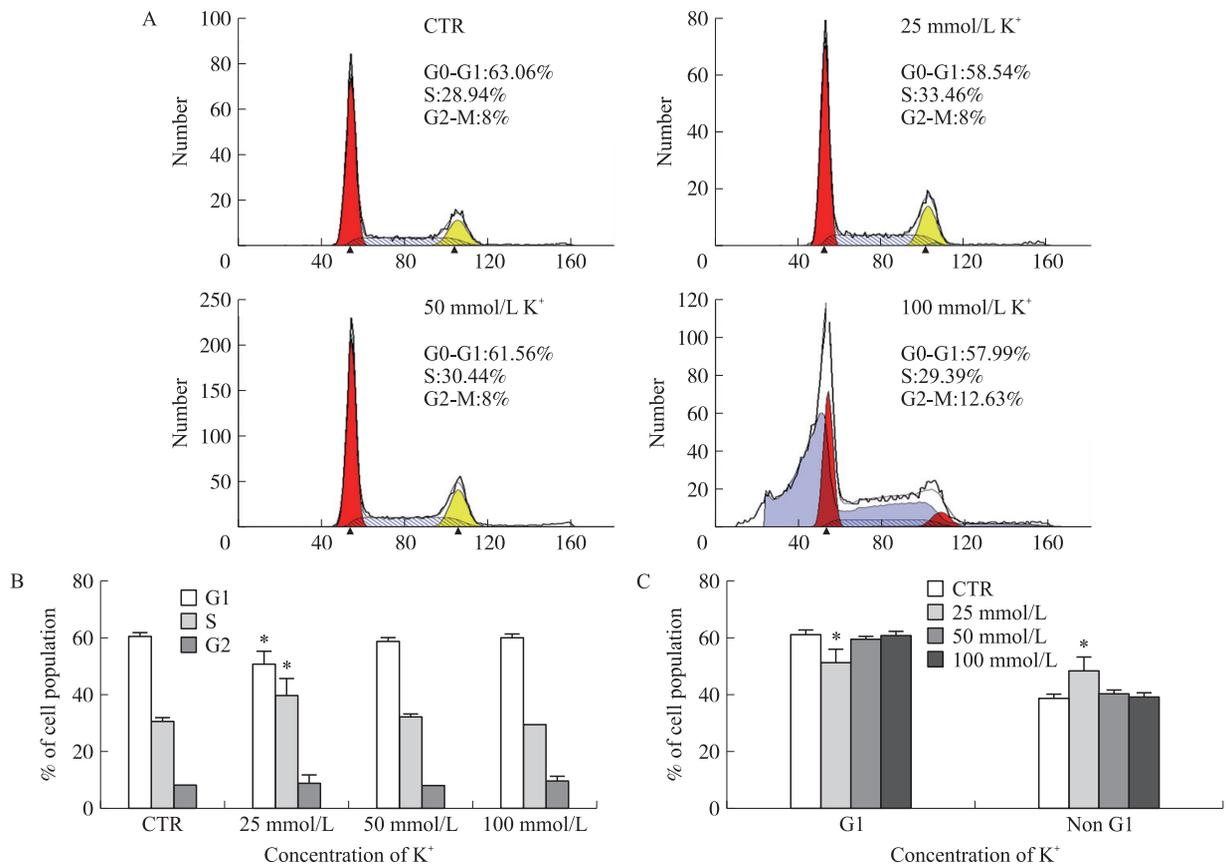
A: 原代肌母细胞在高浓度 K⁺ 培养基中培养 24 h 和 48 h 后的细胞数量变化; B: 高浓度 K⁺ 培养基培养 24 h 和 48 h 后细胞增殖率的统计分析图 (n=3, * P<0.05).

图 1 细胞膜去极化促进原代肌母细胞的增殖

Fig. 1 Plasma membrane depolarization enhances the proliferation of primary myoblasts

2.2 细胞膜去极化影响原代肌母细胞的周期

以上结果表明细胞膜去极化可促进细胞的增殖. 为了研究细胞膜去极化对于细胞增殖的调节特征, 实验用流式细胞技术进行了细胞周期测定. 结果发现(图 2), 与对照相比, 25 mmol/L K⁺ 培养基处理后 G1 期的细胞数量明显降低 (51±4.4% vs 61±1.2%, P<0.05), 而 S 期的细胞数量则增加 (40±6.3% vs 31±1.2%, P<0.05). 当 K⁺ 浓度高至 50 mmol/L 和 100 mmol/L 时, S 期的细胞数量又是减少的, 较对照组无显著变化. 这一结果与以上细胞计数结果一致.



A: 原代肌母细胞在高浓度 K⁺ 培养基中培养 24 h 后的细胞周期时相变化代表图; B, C: 细胞周期的统计分析结果图 (n=3, * P<0.05).

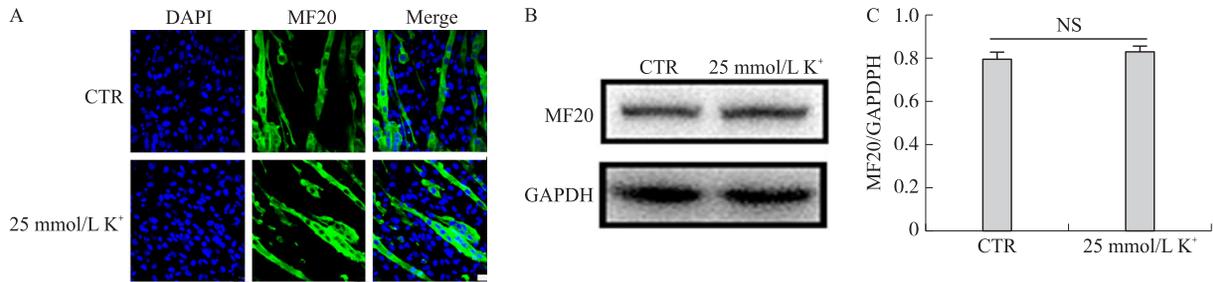
图 2 细胞膜去极化影响原代肌母细胞周期

Fig. 2 Plasma membrane depolarization affects the cell cycle of primary myoblasts

2.3 细胞膜去极化处理不影响原代肌母细胞的肌分化能力

细胞膜去极化可促进肌母细胞的增殖, 那么去极化处理后细胞的肌分化能力是否会受到影响? 本研究将小鼠原代肌母细胞于含 25 mmol/L K⁺ 浓度的生长培养基中培养 48 h 后, 加入常规分化培养基诱导细胞分化 3 d, 收获细胞进行免疫荧光染色. 结果发现(图 3A), 分化的肌管从形态、大小等均与对照没有区

别. Western blot 结果也表明(图 3B 和 C),肌管表达的特征性结构蛋白肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, 以 MF20 抗体检测)的表达也没有差异. 这一结果表明,胞外高浓度 K^+ 引起的细胞膜去极化在促进肌母细胞增殖的同时,不会影响细胞的肌分化能力.



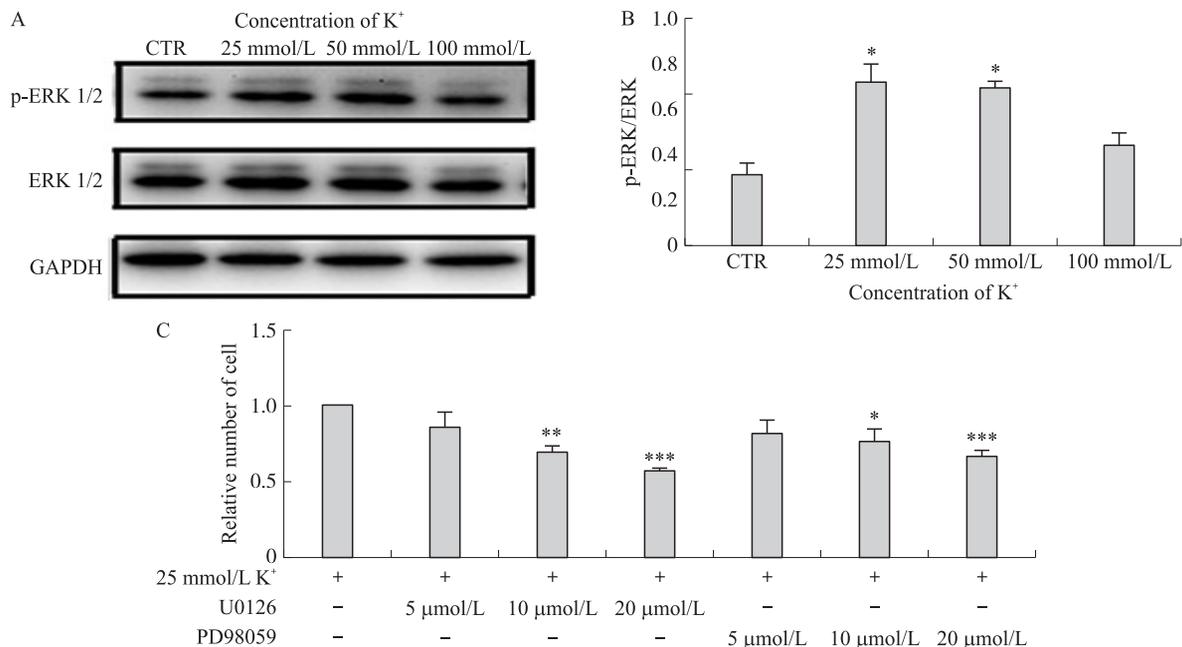
A:含 25 mmol/L K^+ 的培养基培养原代肌母细胞,48 h 后加入分化培养基诱导细胞肌分化 3 d, MF20 抗体进行免疫荧光染色显示分化的肌管(绿色)(Scale bar:10 μ m);B:Western blot 分析细胞诱导分化 3 d 肌管中 MF20 的表达;C:对图 B 中 MF20 的表达进行灰度分析($n=3$, NS:无显著性差异).

图 3 细胞膜去极化处理不影响细胞的肌分化能力

Fig. 3 Depolarization of plasma membrane does not affect the myogenic differentiation potential

2.4 细胞膜去极化通过 MAPK 途径促进原代肌母细胞增殖

原代肌母细胞在常规培养基中生长到一定密度后,用含不同 K^+ 浓度的无血清 F10 培养基分别处理细胞 1 h,收取细胞. 细胞裂解液离心后的上清进行聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western blot 分析. 结果显示(图 4A、B),与对照组相比,浓度为 25 mmol/L 和 50 mmol/L 的 K^+ 处理后,ERK1/2 的磷酸化(p-ERK1/2)水平显著升高,但 100 mmol/L 处理并不能升高 p-ERK1/2 水平. 通常 ERK1/2 磷酸化激活后是促进细胞增殖的^[17-18]. 为验证 ERK1/2 的活化是否参与细胞增殖的调节,实验用两种 ERK1/2 的抑制剂 PD98059 和 U0126 分别加入 25 mmol/L K^+ 浓度的生长培养基中. 结果发现(图 4C),二者均以剂量依赖方式抑制了细胞的增殖. 以上结果表明,细胞膜去极化促进小鼠原代肌母细胞的增殖能力是通过促进 MAPK 信号通路中 ERK1/2 的激活来实现的.



A:高浓度 K^+ 处理后肌母细胞中 ERK1/2 的活化;B:图 A 中相关蛋白条带的灰度分析结果;C:在含有 25 mmol/L K^+ 的 GM 中加入不同剂量的两种 ERK1/2 抑制剂后肌母细胞培养 48 h,收集细胞进行计数及统计分析结果($n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

图 4 细胞膜去极化对肌母细胞中 ERK1/2 的活化的影响

Fig. 4 Effects of plasma membrane depolarization on activation of ERK1/2 in primary myoblasts

3 结论

本文发现,利用细胞外一定范围的高浓度 K^+ 处理引起细胞质膜去极化可明显促进小鼠原代肌母细胞的增殖,促进细胞从 G1 期进入 S 期. 然而,过高浓度的 K^+ 如 50 mmol/L 和 100 mmol/L 时,则没有促进细胞增殖的作用. 一般认为,在细胞周期中,细胞的膜电位处于震荡状态,通常在 G1 期时,细胞膜处于去极化状态,而在 S 期前会出现一个短暂剧烈的超极化状态,进入 S 期后细胞再进入持续的去极化状态^[19-22]. 适当升高细胞外的 K^+ 浓度可能有利于细胞通过 G1 期和分裂期,而对于 S 期则会有一定的阻滞作用,但对于细胞的最终影响是促使细胞通过细胞周期. 胞外 K^+ 浓度过高如本文的 50 mmol/L 和 100 mmol/L 时,则可能阻止细胞进入 S 期,最终抑制细胞的增殖甚至细胞的死亡. 在细胞外 K^+ 达到 25 mmol/L 时,对于细胞的增殖具有明显的促进作用,同时不影响其正常的肌分化潜能. Fennelly 等的研究发现,10 mmol/L 和 20 mmol/L 葡萄糖酸钾处理细胞引发的细胞膜去极化可促进肌卫星细胞的增殖^[16]. 相反,也有文献报道 K^+ 通道激活剂处理显著抑制 C2C12 细胞的增殖^[23]. 考虑到 Fennelly 等的研究是在培养基中额外加入 K^+ ,而原完全培养基中的 K^+ 浓度为约 5 mmol/L,因此他们的培养基 K^+ 浓度为 20 mmol/L 的研究结果与本文的 25 mmol/L K^+ 结果一致.

目前文献采用的细胞膜去极化方法包括 Na^+/K^+ 泵抑制剂如乌本苷(Ouabain)、高浓度 K^+ 处理细胞、 K^+ 通道抑制剂等^[9,16,23-24]. 其中提高胞外 K^+ 浓度的方法有:细胞培养体系中添加高浓度葡萄糖酸钾和 KCl 等^[9,16]. 考虑到抑制剂可能存在的非特异性以及额外添加 K^+ 可能造成的细胞高渗应激反应^[25],本文特定制了完全不含 KCl 和 NaCl 的培养基,以避免上述影响.

虽然细胞的增殖、分化等相关的细胞膜电位改变已经有较多的研究,但其机制长期不清楚. 直到最近才发现,在小鼠的神经母细胞瘤和果蝇胚胎中,细胞膜去极化通过在纳米水平重新组织细胞膜脂质小泡的磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS),导致 Ras 形成纳米簇,促进了 Ras 依赖的 MAPK 信号通路的激活^[9]. 本文的研究也发现,去极化可增强小鼠肌母细胞 ERK1/2 的激活,并与促进细胞增殖的效应相关. 提示去极化促进细胞的增殖在不同细胞中可能存在相似的机制.

综上,培养基中高浓度的 K^+ 可通过激活 ERK1/2 信号通路促进小鼠原代肌母细胞增殖,且不影响其肌分化潜能.

[参考文献]

- [1] BLACKISTON D J, MCLAUGHLIN K A, LEVIN M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle[J]. *Cell cycle*, 2009, 8(21): 3527-3536.
- [2] SUNDELACRUZ S, LEVIN M, KAPLAN D L. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation[J]. *Stem cell reviews and reports*, 2009, 5(3): 231-246.
- [3] SUNDELACRUZ S, LEVIN M, KAPLAN D L. Depolarization alters phenotype, maintains plasticity of predifferentiated mesenchymal stem cells[J]. *Tissue engineering part A*, 2013, 19(17-18): 1889-1908.
- [4] BALITSKY K P, SHUBA E P. Resting potential of malignant tumour cells[J]. *Acta-Union internationalis contra cancerum*, 1964, 20(3): 1391-1393.
- [5] CONE C D, CONE C M. Induction of mitosis in mature neurons in central nervous system by sustained depolarization[J]. *Science*, 1976, 192(4235): 155-158.
- [6] RAYA A, KAWAKAMI Y, RODRIGUEZ E C, et al. Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination[J]. *Nature*, 2004, 427(6970): 121-128.
- [7] TSENG A S, BEANE W S, LEMIRE J M, et al. Induction of vertebrate regeneration by a transient sodium current[J]. *Journal of neuroscience*, 2010, 30(39): 13192-13200.
- [8] BUCKINGHAM M. Skeletal muscle formation in vertebrates[Review][J]. *Current opinion in genetics & development*, 2001, 11(4): 440-448.
- [9] ZHOU Y, WONG C O, CHO K J, et al. Signal transduction. Membrane potential modulates plasma membrane phospholipid dynamics and K-Ras signaling[J]. *Science*, 2015, 349(6250): 873-876.

- [10] KAHANE N, CINNAMON Y, KALCHEIM C. The origin and fate of pioneer myotomal cells in the avian embryo[J]. *Mechanisms of development*, 1998, 74(1-2):59-73.
- [11] PARTRIDGE T A, MORGAN J E, COULTON G R, et al. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to-positive by injection of normal myoblasts[J]. *Nature*, 1989, 337(6203):176-179.
- [12] HUARD J, BOUCHARD J P, ROY R, et al. Human myoblast transplantation: preliminary results of 4 cases[J]. *Muscle & nerve*, 1992, 15(5):550-560.
- [13] WEIYI L, YEFEI W, PENG PENG B, et al. Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation[J]. *Development*, 2012, 139(16):2857-2865.
- [14] YU X W, DUMONT N A, RUDNICKI M A. Muscle stem cells at a glance[J]. *Journal of cell science*, 2014, 127(21):4543-4548.
- [15] RANDO T A, BLAU H M. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy[J]. *The journal of cell biology*, 1994, 125(6):1275-1287.
- [16] FENNELLY C, WANG Z, CRISWELL T, et al. Sustained depolarization of the resting membrane potential regulates muscle progenitor cell growth and maintains stem cell properties *in vitro*[J]. *Stem cell reviews & reports*, 2016, 12(6):1-11.
- [17] ALLBROOK D. Skeletal muscle regeneration[J]. *Muscle & nerve*, 1981, 4(3):234-235.
- [18] YOHANNES M, YOHANNES T. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: is subcellular localization the answer[J]. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2009, 8(8):1168-1175.
- [19] JR C C. Electroosmotic interactions accompanying mitosis initiation in sarcoma cells *in vitro*[J]. *Transactions of the New York academy of sciences*, 1969, 31(4):404-427.
- [20] SACHS H G, STAMBROOK P J, EBERT J D. Changes in membrane potential during the cell cycle[J]. *Experimental cell research*, 1974, 83(2):362-366.
- [21] MAGNI M, MELDOLESI J, PANDIELLA A. Ionic events induced by epidermal growth factor. evidence that hyperpolarization and stimulated cation influx play a role in the stimulation of cell growth[J]. *Journal of biological chemistry*, 1991, 266(10):6329-6335.
- [22] BOONSTRA J, MUMMERY C L, TERTOOLEN L G J, et al. Cation transport and growth regulation in neuroblastoma cells. Modulation of K^+ -transport and electrical membrane properties during the cell cycle[J]. *Journal of cellular physiology*, 2010, 107(1):75-83.
- [23] FABIO A I, ELISABETTA P, VINCENZO B, et al. Expression, localization, and pharmacological role of Kv7 potassium channels in skeletal muscle proliferation, differentiation, and survival after myotoxic insults[J]. *Journal of pharmacology & experimental therapeutics*, 2010, 332(3):811-820.
- [24] MOROKUMA J, BLACKISTON D, ADAMS D S, et al. Modulation of potassium channel function confers a hyperproliferative invasive phenotype on embryonic stem cells[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2008, 105(43):16608-16613.
- [25] LI Z H, ALVAREZ V E, GAUDENZI J G D, et al. Hyperosmotic stress induces aquaporin-dependent cell shrinkage, polyphosphate synthesis, amino acid accumulation, and global gene expression changes in *trypanosoma cruzi*[J]. *Journal of biological chemistry*, 2011, 286(51):43959-43971.

[责任编辑:黄敏]