

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00373

低频磁刺激对人神经干细胞生长和分化的影响

卢旺盛¹, 田增民^{1*}, 郭欣茹¹, 霍小林², 刘爽¹, 李志超¹, 王亚明¹

1. 海军总医院全军神经外科中心, 北京 100037

2. 中国科学院电工研究所生物电磁研究组, 北京 100080

[摘要] **目的:**探讨体外不同条件的磁刺激对神经干细胞细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡和细胞分化等方面的影响。**方法:**对离体人胚神经干细胞进行磁刺激处理,采用频率 0.5 Hz,脉冲刺激波宽为 72 μ s,刺激强度为阈上刺激 1.44 T,每天 1 次,连续刺激 3 d。按刺激次数分为 A 组(30 个脉冲刺激/次)、B 组(60 个脉冲刺激/次)、C 组(90 个脉冲刺激/次)、D 组(对照组,不进行磁刺激处理);用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测磁刺激对神经干细胞增殖的作用;用流式细胞术检测磁刺激对神经干细胞的细胞周期、细胞凋亡和细胞分化的作用。**结果:**A、B、C 组神经干细胞在接受磁刺激后 24~48 h 的 *D* 值较 D 组明显增高($P < 0.05$),提示磁刺激对神经干细胞有轻度促增殖作用;A、B、C 组 G_0/G_1 期细胞比例稍低于 D 组,而相应的 G_2/M 比例较高,但无统计学差异;A、B、C 组 β -tubulin 阳性细胞比例较 D 组高,神经元比例由 21.70% 上升至 34.17% ($P < 0.05$)。**结论:**磁刺激在轻度促进细胞增殖的条件下,可诱导神经干细胞向神经元方向分化,有利于神经功能重建。

[关键词] 神经干细胞;磁刺激;细胞分化;神经元;细胞增殖

[中图分类号] R 741.02 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)04-0373-05

Effects of low-frequency magnetic stimulation on proliferation and differentiation of human neural stem cells *in vitro*

LU Wang-sheng¹, TIAN Zeng-min^{1*}, GUO Xin-ru¹, HUO Xiao-lin², LIU Shuang¹, LI Zhi-chao¹, WANG Ya-ming¹

1. Department of Neurosurgery, General Hospital of Navy, Beijing 100037, China

2. Bioelectromagnetics Research Group, Institute of Electrical Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 10008

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of different magnetic stimulations on cell proliferation, cell cycle, apoptosis, and cell differentiation of human fetal neural stem cell *in vitro*. **Methods:** Isolated neural stem cells were exposed to magnetic stimulation (with a frequency of 0.5 Hz, a wave wide of 72 μ s and an intensity of 1.44 Tesla) once daily for 3 days. The cells were divided into three groups according to the pulses of magnetic stimulation each time; A group (thirty pulses each time), B group (sixty pulses each time), C group (ninety pulses each time) and D group (control group). MTT assay was applied to detect the proliferation activity of the neural stem cells, and flow cytometry was employed to detect the effect of magnetic stimulation on cell cycle, cell apoptosis, and cell differentiation. **Results:** The *D* values of neural stem cells in A, B, and C groups were significantly higher than those in the control group 24 to 48 hours after stimulation ($P < 0.05$), indicating a slightly promoted proliferation of neural stem cells after magnetic stimulation. The proportions of G_0/G_1 phase cells of A, B, and C groups were less than those of the control group, and the proportion of G_2/M -phase cells was higher than that of the control group. The proportions of β -tubulin positive neurons in A, B, and C groups were higher than those in the control group as demonstrated by flow cytometry, and the proportion of neurons increased from 21.70% to 34.17% ($P < 0.05$). **Conclusion:** Under proper condition, magnetic stimulation can slightly promote cell proliferation and can induce neural stem cell differentiation into neurons *in vitro*, which may benefit neural function reconstruction.

[KEY WORDS] neural stem cells; magnetic stimulation; cell differentiation; neuron; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(4): 373-377]

神经干细胞(neural stem cell, NSC)是一种具有自我更新能力,能够分化出神经元、胶质细胞等多种类型神经细胞的特殊细胞^[1]。NSC 的活化、增殖和分化机制是当前干细胞研究的热点,如何调控 NSC

[收稿日期] 2008-08-16 **[接受日期]** 2008-09-17

[基金项目] 中国博士后科学基金(20070420564). Supported by China Postdoctoral Science Foundation(20070420564).

[作者简介] 卢旺盛,博士,副主任医师. Email: luws71@sina.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 010-66958514, E-mail: tianzengmin@vip.sina.com

的分化是神经干细胞领域的重要问题之一^[2]。目前关于 NSC 分化的研究主要侧重于化学性因素,仍未取得共识性结论。经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS)是新近发展起来的一项用于脑功能研究的技术,具有非接触、无创、无痛或微痛等优点,目前已被用于抑郁症、强迫症、帕金森病和癫痫等疾病的治疗^[3],在脑可塑性研究中也取得一定成果^[4],但关于磁刺激对 NSC 影响的研究尚少,磁刺激能否促进 NSC 的增殖与分化,影响其细胞周期,并促进其与病损周围的神经网络形成功能性突触联系,促进轴芽生成与功能重塑,这些均是本领域需要回答的问题。本研究以磁刺激对离体人 NSC 进行干预,旨在了解磁刺激对体外 NSC 的生长、分化影响,为进一步的体内研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 兔抗巢蛋白 Nestin 单克隆抗体(Sigma 公司),鼠抗人 β -tubulin 单克隆抗体(Sigma 公司),兔抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体(武汉博士德公司),羊抗兔、羊抗鼠异硫氰酸荧光黄(fluorescein isothiocyanate, FITC)荧光二抗(北京中杉公司),羊抗兔、羊抗鼠罗丹明荧光二抗(Sigma 公司,1:10~1:20)。细胞周期试剂盒(Keygen 公司),细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC Apoptosis Kit, Biodec Biopharme 公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma 公司);DMEM、胎牛血清等细胞培养用试剂(Gibco BRL 公司)。NSC 取自孕 13 周左右引产的人源胚胎,经传代培养后取第 3 代或第 4 代的 NSC。流式细胞仪(美国 B-D 公司);全自动酶标仪(DG3022A, LABSYSTEMS, Finland);经颅磁刺激器(中国科学院电工研究所生产)。

1.2 分组与磁刺激方法 将磁刺激线圈水平放在培养瓶或培养板中心上方 2 cm 处,频率 0.5 Hz,脉冲刺激波宽为 72 μ s,每组刺激强度为阈上刺激,1.44 T,每天 1 次,每次给予若干个脉冲磁刺激,连续刺激 3 d。按刺激次数分为 A 组(30 个脉冲刺激/次)、B 组(60 个脉冲刺激/次)、C 组(90 个脉冲刺激/次)、D 组(对照组,不进行磁刺激处理)。处理组进行磁刺激时置于相同的外部环境。

1.3 细胞鉴定及生长形态观察 对待处理的 NSC 行 nestin、 β -tubulin 和 GFAP 免疫细胞化学检测染色。干预前及干预后 24 h 至第 7 天,在相差显微镜下观察各组 NSCs 生长形态。

1.4 MTT 比色法测定细胞活力 磁刺激 24 h、48 h、72 h 及第 7 天,从每组取 1 ml 细胞悬液移入 96

孔酶标板,每孔含培养液 180 μ l,加入 MTT 20 μ l,继续培养 3~4 h,96 孔板离心去上清,每孔加入 100 μ l DMSO,在连续波长酶标仪上测光密度(D)值,测定波长为 490 nm。MTT 检测重复进行 3 次。计算增殖率:生长增殖率 = $(1 - D_{\text{实验组}} / D_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.5 细胞周期和细胞凋亡的检测 以 5×10^6 /瓶密度接种 NSC 于 25 ml 培养瓶,磁刺激停止后,于 3 d 和 7 d 后行流式细胞术检查。细胞周期检测前用胰酶消化,离心后弃上清,用 0.1% PBS(pH 7.4)洗涤,用预冷的 70% 乙醇固定,4 $^{\circ}$ C 过夜。用 PBS 配制成单细胞悬液,碘化丙啶染色液(PI, 0.1% Triton X-100, 20 μ g/ml PI, 100 μ g/ml RNaseA)室温染色 30 min 后用流式细胞仪分析细胞周期。细胞凋亡检测前将待测细胞制成单细胞悬液, PBS 溶液洗 2 次,取 195 μ l 的细胞悬液加入 5 μ l Annexin V-FITC,混匀后于室温避光孵育 10 min;用 190 μ l 的结合缓冲液洗细胞 2 次,加入 10 μ l 20 μ g/ml 的 PI 溶液(终浓度为 1 μ g/ml);室温避光孵育,1 h 内用流式细胞仪检测。

1.6 细胞分化的检测 磁刺激停止后,加入有血清的培养基进行 NSC 的诱导分化培养,分别于 3 d、7 d 后行流式细胞术检查。用 0.25% 胰酶消化盖玻片上的细胞,离心 8 min,4% 多聚甲醛室温固定 30 min,0.5% H_2O_2 -甲醇液处理 30 min,1% 牛血清白蛋白-0.3% Triton X-100 37 $^{\circ}$ C 处理 30 min,加入一抗(β -tubulin 1:100; GFAP 1:100)37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后,置于 4 $^{\circ}$ C 的冰箱 24 h,加入 FITC(1:100)和罗丹明(1:100)于室温环境染色 30 min。将标本混匀后采集样本,用流式细胞仪检测。每组取 3 个样本,每样本计数 10 000 个细胞,并计算其阳性率。在 480 nm 的激发光下,检测 β -tubulin 和 GFAP 各占细胞总数的百分比。

1.7 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,应用单因素方差分析进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态观察 相差显微镜下观察原代培养的 NSC 生长状况,可见培养 24 h 后大量活细胞均匀分布,部分沉于培养瓶底壁,部分细胞悬浮于培养液中,细胞成对出现者较多,并可见细胞分裂相;72 h 后出现许多细胞聚集形成的细胞团,5 d 后较大的细胞团大约有数十或数百个细胞即神经球(图 1A),神经球呈悬浮生长,细胞排列紧密,细胞边界清楚,折光性强。培养 7 d 后,细胞克隆团中细胞数明显增多。其增殖速率相对稳定,随着时间的延长,其增殖有

减缓趋势。NSC通过免疫荧光染色可显示有Nestin阳性(图1B),同时部分细胞可分化为 β -tubulin和GFAP阳性细胞(图1C、1D),表现出多分化潜能趋势。磁刺激对刚经受机械刺激的吹散单个悬浮生长细胞影响较大,它们易被磁场破坏;而对悬浮生长

1 d的细胞无明显破坏作用。在后者条件下磁刺激后1~7 d,各组NSCs均呈克隆球形悬浮生长,状态良好,胞体圆而透亮,各组之间克隆形成及体积大小无明显差异,部分细胞呈明显增殖分化状态,同时可见未分化悬浮生长的干细胞。

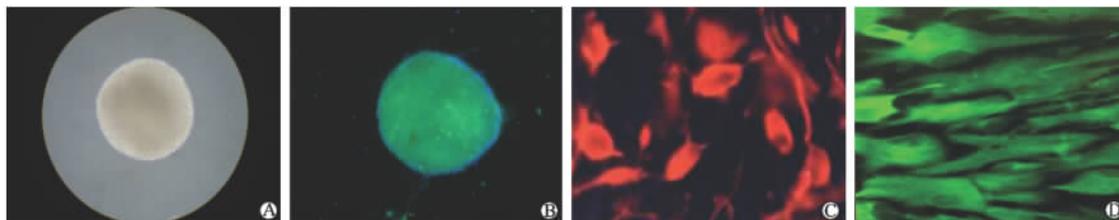


图1 神经干细胞形态学

Fig 1 Morphology of neural stem cells

A: Microscopic view of neurosphere, original magnification: $\times 100$; B: Nestin staining was positive in neurosphere, original magnification: $\times 100$; C: β -tubulin staining was positive in differentiated neurospheres, original magnification: $\times 400$; D: GFAP staining was positive in differentiated neurospheres, original magnification: $\times 400$

2.2 细胞增殖率 磁刺激后24、48、72 h及1周,不同条件的磁刺激对NSC的增殖率见图2。结果表明,A、B、C组NSC增殖率在24 h后开始增高,增殖率在48 h后至最高,达22.7%,然后逐渐回落,A、B、C组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

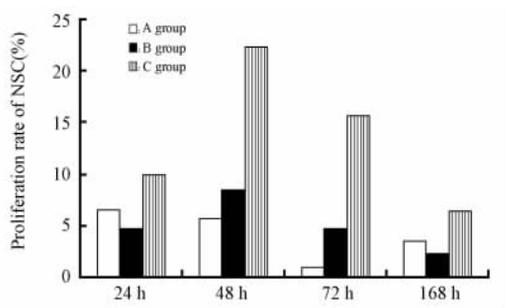


图2 磁刺激对NSC增殖率的影响

Fig 2 Effect of magnetic stimulation

on proliferation rate of neural stem cells

A group: Thirty pulses each time; B group: Sixty pulses each time; C group: Ninety pulses each time

2.3 细胞周期和细胞凋亡变化 磁刺激组 G_0/G_1 期细胞比例(%)稍低于对照组,以C组 G_0/G_1 期细胞比例最低,但较对照组无统计学差异,各种不同条件的磁刺激组间也无显著性差异($P > 0.05$,图3)。磁刺激后,细胞碎片增多,早期细胞凋亡率略有增加,但各组间无统计差异。

2.4 细胞分化 β -tubulin是一种神经元标记物,磁刺激可促进NSC向神经元方向定向分化,磁刺激组神经元比例较D组高,由21.70%上升至34.17%,有统计学差异($P < 0.05$)。而磁刺激三组

之间无显著性差异(图4)。GFAP是神经胶质细胞的标记物,磁刺激组NSC分化为胶质细胞的比例较D组减少($P < 0.05$,图4)。

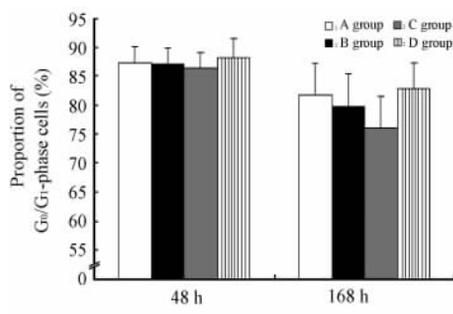


图3 磁刺激对NSC G_0/G_1 期比例的影响

Fig 3 Effect of magnetic stimulation

on cell cycle of neural stem cells

A group: Thirty pulses each time; B group: Sixty pulses each time; C group: Ninety pulses each time; D group: Control. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

NSC的成功分离培养为许多棘手的神经系统疾病如神经退行性疾病和中枢神经系统损伤的治疗带来了曙光,目前对NSC的增殖、分化的研究是本领域的关键问题,而当前大多限于化学因素对其影响的研究,较少从物理因素角度进行研究,而NSC的细胞活动中却伴随着离子强度、电信号、磁信号的改变等,电信号、磁信号的改变反过来会影响细胞活动。我们以0.5 Hz交变磁场为干预手段,对NSC的增殖和分化进行探索,发现了一些有价值的结果。

3.1 磁刺激对NSC生长增殖的影响 磁场能影响细胞的活动,但细胞对磁场的敏感性与磁场的强度、

类型和处理时间有关^[5-6]。磁刺激是通过脉冲磁场诱导产生的感应电流激活神经组织内的可兴奋性细胞,而 NSC 具有子代细胞可兴奋性和稳定性的双重电生理特性,磁刺激对 NSC 有潜在性影响。结合临床和用于体内研究的磁刺激器的性能,本研究中主要采用了 0.5 Hz、磁场强度为 1.44 T 的脉冲,对不同时间点的 NSC 进行磁刺激。形态学观察表明,该参数的磁刺激对神经球 NSC 的生长形态无明显影响,而对刚经受机械刺激的吹散单个悬浮生长细胞影响较大,它们易被磁场破坏;而对悬浮生长 1 d 的细胞无明显破坏作用。以上结果表明磁场对细胞生长有一定影响,但如果考虑在合适的细胞生长时期进行磁刺激处理,可以将这种负性作用降至最小。

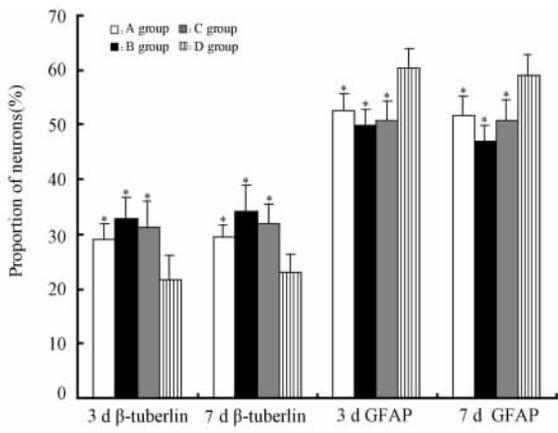


图 4 不同条件磁刺激对 NSC 分化的影响

Fig 4 Effect of magnetic stimulation on cell differentiation of neural stem cells

A group: Thirty pulses each time; B group: Sixty pulses each time; C group: Ninety pulses each time; D group: control. * $P < 0.05$ vs D group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

MTT 比色法结果发现,NSC 在干预后 24~48 h 呈现轻度的促生长增殖作用,随着时间推移,在 1 周后这种作用可以逐渐恢复正常,这种作用并不随脉冲次数的增加而增加。另一方面在本磁场强度和刺激频率条件下,NSC 生长良好,脉冲磁刺激对 NSC 生长无明显副作用。通过磁刺激对 NSC 的细胞周期和细胞凋亡影响分析,表明 NSC 在刚接受磁刺激后细胞更多地处于 G_2/M 期,相应 G_0/G_1 期细胞比例较低,细胞增殖活性增加,这与 MTT 结果发现磁刺激促进 NSC 增殖的结果是一致的。细胞早期凋亡在接受磁刺激后发生率较对照组略高但无统计学差异,目前这方面的研究不多,可能与磁刺激干预了细胞分裂与凋亡过程中的信号有关。

3.2 磁刺激对 NSCs 分化的影响 NSC 有两种不同

的增殖方式:一种是对称分裂,即分裂所产生的子代均为干细胞。另一种是不对称分裂,即分裂所产生的子代分为两类:一类是 NSC,另一类是祖细胞,这类细胞仅有有限的自我更新能力,终将逐步分化成熟,成为神经元或神经胶质细胞。正常情况下成年哺乳动物脑内的 NSC 处于静息状态,在脑组织受损的情况下,释放出一定的信号分子,NSC 增殖并向特定的方向转化成特定的神经细胞,最后与残存的脑组织形成功能性联系,这构成脑可塑性的重要物质基础,而目前对其分化机制知之甚少^[7],主要研究侧重于化学性因素的作用,包括 EGF、FGF2 等因子^[8-9],但仍未取得共识性研究结论^[10-11],而物理性因素的作用报道较少^[12]。吴全义等^[13]等研究发现 5~60 mT 的稳恒磁场作用能明显抑制中脑神经细胞的分化,但李怡等^[14]研究提示 5 Hz 和 20 Hz 正弦交变磁场(8 mT)可以促进 NSC 向神经元方向定向分化,这提示恒磁场与交变磁场的作用机制可能有所不同。但 5 Hz 和 20 Hz 正弦交变磁场属于高频磁场,临床应用中有致癫可能性,安全性问题限制了其应用。本组选择频率 0.5 Hz,每组刺激强度为阈上刺激 1.44 T,主要考虑磁刺激最终要进行体内研究,而当前认为 0.5 Hz 频率、1.44 T 强度刺激安全度最高。选择不同的脉冲次数,包括 30 个、60 个、90 个脉冲刺激/次,尝试探索不同的脉冲次数来找到最合适的参数,本研究结果提示 A、B、C 各组神经元方向分化的比例大于 D 组,有统计学差异,这提示磁刺激可促进 NSC 向神经元方向定向分化。但磁刺激 3 组之间无统计学差异,磁刺激并不呈磁总量-效果线性关系,因此本组采用的 3 种脉冲次数对诱导分化作用无明显差异,尚需进一步摸索刺激参数以达到最优的诱导分化作用。

[参考文献]

[1] Imitola J. Prospects for neural stem cell-based therapies for neurological diseases [J]. Neurotherapeutics, 2007, 4: 701-714.
 [2] Robertson M J, Gip P, Schaffer D V. Neural stem cell engineering: directed differentiation of adult and embryonic stem cells into neurons [J]. Front Biosci, 2008, 13: 21-50.
 [3] Simons W, Dierick M. Transcranial magnetic stimulation as a therapeutic tool in psychiatry [J]. World J Biol Psychiatry, 2005, 6: 6-25.
 [4] Mally J, Dinya E. Recovery of motor disability and spasticity in post-stroke after repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) [J]. Brain Res Bull, 2008, 76: 388-395.
 [5] Bassett C A. Beneficial effects of electromagnetic fields [J]. J Cell Biochem, 1993, 51: 387-393.
 [6] Raylman R R, Clavo A C, Wahl R L. Exposure to strong static magnetic field slows the growth of human cancer cells *in vitro* [J]. Bioelectromagnetics, 1996, 17: 358-363.
 [7] Gage F H. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287: 1433-1438.

- [8] Qian X, Davis A A, Goderie S K, Temple S. FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells[J]. *Neuron*, 1997, 18: 81-93.
- [9] Maurer M H, Schäbitz W R, Schneider A. Old friends in new constellations—the hematopoietic growth factors G-CSF, GM-CSF, and EPO for the treatment of neurological diseases[J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15: 1407-1411.
- [10] Johe K K, Hazel T G, Muller T, Dugich-Djordjevic M M, McKay R D. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system[J]. *Genes Dev*, 2003, 10: 3129-3140.
- [11] White P M, Morrison S J, Orimoto K, Kubu C J, Verdi J M, Anderson D J. Neural crest stem cells undergo cell intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals[J]. *Neuron*, 2001, 29: 57-71.
- [12] Lai B, Mao X O, Greenberg D A, Jin K. Endothelium-induced proliferation and electrophysiological differentiation of human embryonic stem cell-derived neuronal precursors[J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17: 565-572.
- [13] 吴全义, 端礼荣, 杜玉珍, 刘方平. 稳恒磁场对体外胚胎中脑神经元细胞分化影响的研究[J]. *中国医学物理学杂志*, 1999, 16: 258-259.
- [14] 李 怡, 赵 仑, 邢 莹, 娄淑杰, 何 成, 路长林. 5 Hz 和 20 Hz 磁场对中脑神经干细胞分化的影响[J]. *航天医学与医学工程*, 2002, 15: 374-376.

[本文编辑] 孙 岩