

· 基础研究 ·

脉冲强磁场对新生大鼠神经干细胞 β -连接素表达的影响

邹丽丽 许涛 龙兴蓝 石磊 彭涛

【摘要】目的 通过检测神经干细胞 β -连接素基因和蛋白的表达,初步探讨脉冲强磁场(0.1 Hz, 4 T, 8 次)促神经干细胞增殖的作用机制。**方法** 取新生 SD 大鼠双侧脑室下区神经干细胞,无血清培养 2 周,将细胞分成实验组和对照组。实验组的细胞给予 0.1 Hz 4 T 的脉冲强磁场干预 8 次;对照组的细胞置相同条件下不行干预。此后第 1、3、5 和 7 天,分别用 RT-PCR 和 Western blot 检测两组神经干细胞 β -连接素的表达。**结果** 干预后第 1、3、5 和 7 天,RT-PCR 法显示实验组神经干细胞 β -连接素基因表达较对照组明显增高($P < 0.05$);Western blot 也显示实验组神经干细胞 β -连接素蛋白表达较对照组明显增高,增高水平在干预后第 7 天最显著。**结论** 新生大鼠神经干细胞经 0.1 Hz, 4 T 脉冲强磁场干预 8 次后, β -连接素在基因及蛋白水平均增高,提示脉冲强磁场(0.1 Hz, 4 T, 8 次)促神经干细胞增殖的机制可能是通过激活 Wnt/ β -连接素通路实现。

【关键词】 脉冲强磁场; 神经干细胞; 增殖; 机制; Wnt/ β -连接素

The effects of a high-intensity pulsed electromagnetic field on the expression of β -catenin in the neural stem cells of neonatal rats ZOU Li-li*, XU Tao, LONG Xin-lan, SHI Lei, PENG Tao. * Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: XU Tao, Email: yxutao@263.com

【Abstract】 Objective To study the mechanism by which a high-intensity pulsed electromagnetic field (HIPEMF) (0.1 Hz, 4 T, 8 pulses) facilitates the proliferation of neural stem cells by detecting the expression of β -catenin genes and protein. **Methods** Neural stem cells (NSCs) were isolated from the sub-ventricular zone (SVZ) of neonatal rats and cultured in supplemented, serum-free medium for two weeks. The NSCs were then divided into an experimental group exposed to a HIPEMF for 8 pulses and a control group given sham stimulation. The gene and protein expression of β -catenin in the NSCs were assayed by RT-PCR and Western blotting on the 1st, 3rd, 5th and 7th day after the stimulation. **Results** The NSCs' cloned spheres were round and translucent, and showed red fluorescence after staining with anti-nestin (cy3). The RT-PCR results showed β -catenin genes were highly expressed in the exposed group (significantly more than in the controls). The Western blotting showed that expression of β -catenin protein was also higher in the experimental group, especially at the 7th day after stimulation, a difference which was also statistically significant. **Conclusion** HIPEMF at 0.1 Hz, 4 T, in 8 pulse trains can promote NSC proliferation, perhaps through the Wnt/ β -catenin signaling pathways.

【Key words】 Electromagnetic stimulation; Neural stem cells; Cell proliferation; Wnt/ β -catenin

脉冲强磁场是一种极端的物理实验条件,因其磁场强度远远高于自然界存在的任何磁场,目前仅被作为一种特殊的实验手段。研究发现,极低频率的脉冲强磁场有选择性杀伤肿瘤组织和抑制肿瘤组织生长的作用,而且对生物体的免疫系统功能起调节作用^[1,2]。

在本研究的前期实验中,将脉冲强磁场作用于新生大鼠神经干细胞,在固定频率(0.1 Hz)和相同脉冲次数(5 次)干预后,神经干细胞在 4 T 和 14 T 强度下出现两个增殖高峰,4 T 实验组较对照组增高近 3 倍,14 T 实验组较对照组增高约 2 倍,确立 4 T 为促增殖的最佳刺激强度;固定频率(0.1 Hz)和场强(4 T)后,发现进行 8 次干预时细胞增殖效应最明显,实验组较对照组增高近 3 倍,并且电镜下观察到神经干细胞内细胞器及染色体都明显增加,出现大量的分裂相,双核细胞的比率较对照组增高(30%/10%)。由此认为,脉冲强磁场有促神经干细胞增殖的作用,且在一定的刺激

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.010.003

基金项目:国家自然科学基金(面上项目)资助(81271732)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复科[邹丽丽(现在河南省人民医院康复科)、许涛、龙兴蓝],骨科(石磊);华中科技大学脉冲强磁场中心(彭涛)

通信作者:许涛,Email:yxutao@263.com

条件下(0.1 Hz, 4 T, 8 次),对神经干细胞促增殖效应最大^[3,4]。

有关神经干细胞增殖的机制:Wnt 被认为是调控增殖的重要途径^[5-7],其中 Wnt/ β -连接素(β -catenin)又是 Wnt 的经典分支;Wnt 有两种存在状态,当 Wnt 信号被激活时, β -连接素水平升高,胞质内蓄积的 β -连接素转入核,启动核内靶基因转录,而 Wnt 信号失活时, β -连接素低表达,不能与核内转录因子结合。所以 β -连接素作为该途径的关键分子,其表达水平间接反映 Wnt 信号的激活或失活状态,常被用于细胞增殖机制的研究。本研究通过对神经干细胞 β -连接素表达进行研究,旨在探讨一定刺激参数下(0.1 Hz, 4 T, 8 次)脉冲强磁场促进神经干细胞增殖的可能机制。

材料与方法

一、实验动物

新生 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

二、神经干细胞培养^[3,4,8]

取新生 SD 大鼠,于无菌操作台内,眼科剪沿新生大鼠人字缝剪开大脑皮肤及颅骨,眼科镊分开颅骨,暴露两侧大脑半球组织,夹取双侧脑室部位的脑组织,放入冷 PBS 液中,漂洗去除组织上的血细胞,小心剥除血管及破碎脑膜,将分离干净的组织转移到盛 PBS 液的圆口瓶中,弯剪将组织块碎成体积约 1 mm³ 大小后,反复吹打组织块,过滤制成细胞悬液,1000 r/min,离心 5 min,小心去除上清液,加入无血清培养基,重新悬浮细胞,将细胞悬液等分入事先装好培养基的 50 ml 细胞培养瓶内,放入培养箱中孵育细胞,培养条件为 37 ℃,5% CO₂ 浓度。细胞在培养箱中培养至第 3 天时,显微镜下观察细胞生长情况,可见大量不规则团块,这是神经干细胞与脑组织残余的杂质细胞所形成的细胞复合体,并有部分细胞坏死后形成的贴壁细胞碎片,此时需进行除渣纯化神经干细胞,以利于细胞生长。除渣后每隔 3 d 换液 1 次,体外培养 1 周后,传代培养 1 次。

三、分组及干预^[3,4]

神经干细胞传代培养 1 次后,继续培养至取材后 2 周,收集细胞到 15 ml 离心管内,转速 1000 r/min,离心 5 min,小心去除上清液,留约 1 ml 的液体于离心管内,将细胞悬液吸入 1 ml 注射器内,去除注射器针头,用分装好的骨蜡封口,将细胞分为实验组和对照组,再根据干预完成后培养天数的不同,将 2 组细胞分为第 1、3、5 和 7 天四个亚组,并标记为实验组(第 1、3、5 和 7 天)和对照组(第 1、3、5 和 7 天)。将标记为实验组的细胞置于脉冲强磁场的磁体内,给予 0.1 Hz 4 T 的脉冲强

磁场干预 8 次;对照组细胞不行磁场干预。刺激完成后,收集实验组和对照组细胞,离心弃上清,加入无血清培养基制成细胞悬液,置于培养箱中继续孵育。

四、检测 β -连接素基因和蛋白表达

1. RT-PCR 检测 β -连接素基因:在脉冲强磁场干预后的第 1、3、5 和 7 天,收集神经干细胞于离心管内,Trizol 法提取总 RNA,并将提取的 RNA 逆转录成 cDNA,具体操作参考逆转录试剂盒。设计并合成内参与目的基因引物,内参肌动蛋白上游引物:5-CGTTGACATCCGTAAAGACCTC-3;下游引物:5-TAGGAGC-CAGGGCAGTAATCT-3;扩增片段长度为 110 bp,退火温度为 58 ℃。目的基因 β -连接素上游引物:5-ACTCTGAGAACTTGTCCGATGC-3;下游引物:5-AG-ATGGCAGGCTCGGTAATG-3,预计扩增产物为 247 bp,退火温度为 58 ℃。向合成的 cDNA 中加入适量的去离子水,稀释至合适的浓度,配成 25 μ l 的反应体系。设定反应条件,95 ℃ 1 min;95 ℃ 15 s;58 ℃ 15 s;72 ℃ 45 s,共进行 40 个循环。

2. Western blot 检测 β -连接素蛋白:在脉冲强磁场干预后第 1、3、5 和 7 天,提取实验组和对照组细胞胞质蛋白。具体步骤依照细胞蛋白提取试剂盒说明书操作,测定蛋白浓度,计算上样量(含 40 μ g 蛋白的溶液体积),将上样量与等体积上样缓冲液混合,在 100 ℃ 的沸水中水浴 5 min,行 SDS-PAGE 凝胶电泳(10% 分离胶,5% 浓缩胶,分离胶 75 V,浓缩胶 120 V),电泳至溴酚蓝刚跑出时开始转膜(200 mA,1 h),5% 脱脂奶粉室温封闭 30 min,加入 β -连接素一抗(1:1000),室温 2 h,洗脱 3 次,每次 5 min,加入二抗(1:3000)室温 45 min,洗脱 3 次,每次 5 min,加入 ECL 试剂反应 2 min,行化学发光检测实验结果,内参为肌动蛋白。

五、统计学分析

根据 Pfaffl^[9]报道的计算公式分析 RT-PCR 结果,数据以($\bar{x} \pm s$)表示 β -连接素基因的表达。Alpha 图像软件分析 Western blot 条带的光密度值,并计算目的条带与内参条带的比值,即目的蛋白的相对表达量,比较实验组和对照组的差异。用 SPSS 18.0 版软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

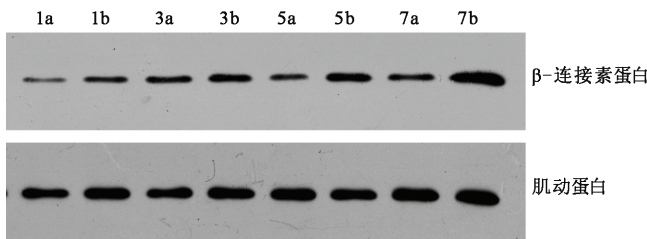
一、RT-PCR 情况

1. 扩增曲线和溶解曲线:实验组和对照组的扩增曲线显示在 16~23 个循环到达指数扩增期,说明模板浓度较为合适;2 组的溶解曲线显示内参肌动蛋白的峰值在 83 ℃, β -连接素的峰值在 84 ℃,且两组曲线均呈单峰分布,说明模板特异性较好,RT-PCR 实验初始条件可靠。

2. 细胞 β -连接素基因水平的比较:利用 Pfaffl^[9] 报道的公式,采用扩增倍数 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值的计算方法,分别得出脉冲强磁场干预后第 1、3、5 和 7 天,实验组神经干细胞内 β -连接素基因相对于对照组变化的扩增倍数分别为 (1.21 ± 0.0315) 、 (1.20 ± 0.0283) 、 (1.37 ± 0.0219) 和 (1.61 ± 0.0269) 。实验组神经干细胞 β -连接素基因表达在第 1、3、5 和 7 天均高于对照组细胞 (均 $P < 0.05$),且以干预后第 7 天增高最为显著。

二、Western blot 检测分析

在脉冲强磁场作用后的第 1、3、5 和 7 天,Western blot 检测实验组和对照组神经干细胞 β -连接素蛋白的表达如图 1 所示。采用 Alpha 图像软件系统,计算各个时间点目的与内参的比值,即 β -连接素蛋白的相对表达量,结果见表 1。



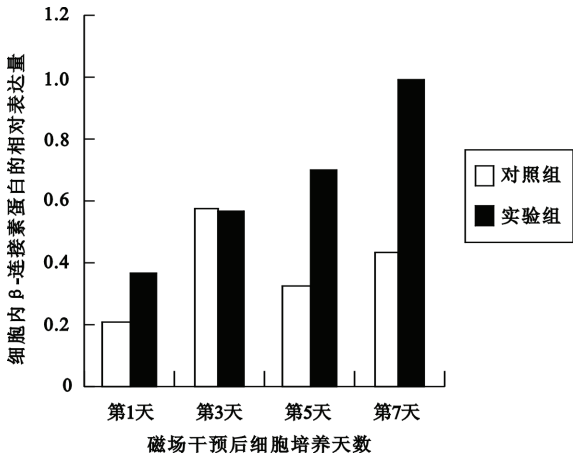
注:1a 为对照组第 1 天;1b 为实验组第 1 天;3a 为对照组第 3 天;3b 为实验组第 3 天;5a 为对照组第 5 天;5b 为实验组第 5 天;7a 为对照组第 7 天;7b 为实验组第 7 天

图 1 Western blot 检测实验组和对照组神经干细胞 β -连接素蛋白及肌动蛋白表达的电泳条带比较

除干预后第 3 天实验组 β -连接素蛋白的相对表达量略低于对照组外,第 1、5 和 7 天实验组神经干细胞 β -连接素蛋白相对表达量均较对照组增高,且以干预后第 7 天增高最显著,实验组较对照组增高约 2.3 倍 (图 2)。

讨 论

神经干细胞增殖主要受外界环境、细胞生长因子等外源性因素和内源性基因水平两种机制的调节^[10]。有研究发现,当神经系统受到外界的各种创伤以后,受损区域残存的神经细胞就会自身增殖,只是再生能力十分有限,而且在增殖的调控上,外源性因素往往通过内源性机制的调节起作用。内源性的调节是在基因水平的调控,主要通过改变细胞内信号通路的状态,调节神经干细胞的增殖。目前比较肯定的是 Wnt 信号通路对增殖的调节作用,已有众多研究证实神经干细胞的增殖和 Wnt 通路的调节有关。细胞内 Wnt 通路有开启 (激活) 和关闭 (失活) 两种状态,主要传递刺激生长信号。Wnt/ β -连接素途径是该通路的经典分支,在神经系统的发育中起重要作用^[11-13], Wnt/ β -连接素途径由配体、跨膜受体、调节蛋白和转录因子四部分组成,配体主要指 Wnt 蛋白家族,跨膜受体包括膜上的 Frz 卷曲蛋白和 LRP,调节蛋白是两类蛋白复合体,即降解蛋白复合体和拮抗蛋白,转录因子位于细胞核, β -连接素进入细胞核后,两者可相互作用,启动基因转录。当 Wnt 通路处于关闭状态时,胞浆内的降解蛋白复合体却是活化状态,结合 β -连接素并使之磷酸化,被磷酸化的 β -连接素降解,无法进入细胞核与转录因子作用,不能启动核内靶基因。Wnt 通路被激活时,位于细胞膜外的配体就与跨膜受体结合,将膜外刺激信号传递到细胞内,胞质内调节 β -连接素的降解复合体解离而失活, β -连接素去磷酸化后在胞质内蓄积,并转入细胞核,与转录因子相互作用,激活下游靶基因,启动基因的转录及表达。因此,在 Wnt 通路激活时,胞质内调控细胞增殖的关键分子 β -连接素的表达水平是增高的^[11,14-15]。



注:在第 1、5 和 7 天,实验组细胞 β -连接素蛋白表达均高于对照组,以干预后第 7 天最显著 (实验组较对照组增高约 2.3 倍)

图 2 实验组和对照组神经干细胞 β -连接素蛋白相对表达量比较

态,调节神经干细胞的增殖。目前比较肯定的是 Wnt 信号通路对增殖的调节作用,已有众多研究证实神经干细胞的增殖和 Wnt 通路的调节有关。细胞内 Wnt 通路有开启 (激活) 和关闭 (失活) 两种状态,主要传递刺激生长信号。Wnt/ β -连接素途径是该通路的经典分支,在神经系统的发育中起重要作用^[11-13], Wnt/ β -连接素途径由配体、跨膜受体、调节蛋白和转录因子四部分组成,配体主要指 Wnt 蛋白家族,跨膜受体包括膜上的 Frz 卷曲蛋白和 LRP,调节蛋白是两类蛋白复合体,即降解蛋白复合体和拮抗蛋白,转录因子位于细胞核, β -连接素进入细胞核后,两者可相互作用,启动基因转录。当 Wnt 通路处于关闭状态时,胞浆内的降解蛋白复合体却是活化状态,结合 β -连接素并使之磷酸化,被磷酸化的 β -连接素降解,无法进入细胞核与转录因子作用,不能启动核内靶基因。Wnt 通路被激活时,位于细胞膜外的配体就与跨膜受体结合,将膜外刺激信号传递到细胞内,胞质内调节 β -连接素的降解复合体解离而失活, β -连接素去磷酸化后在胞质内蓄积,并转入细胞核,与转录因子相互作用,激活下游靶基因,启动基因的转录及表达。因此,在 Wnt 通路激活时,胞质内调控细胞增殖的关键分子 β -连接素的表达水平是增高的^[11,14-15]。

本研究前期研究证实,脉冲强磁场 (0.1 Hz, 4 T, 8 次) 能促进新生大鼠神经干细胞增殖,而且以实验干预后第 7 天的增殖效应最大 (实验组细胞较对照组增高

表 1 实验组和对照组神经干细胞 β -连接素蛋白的表达 (OD)

组别	β-连接素蛋白				肌动蛋白				β-连接素蛋白/肌动蛋白			
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
对照组	55 275	149 310	99 981	142 674	260 266	260 266	309 285	330 615	0.2124	0.5738	0.3233	0.4315
实验组	10 9710	169 218	194 691	338 985	302 886	300 753	279 423	4 177	0.3622	0.5627	0.6968	0.9919

近 3 倍)。本研究是在相同的刺激参数下(0.1 Hz, 4 T, 8 次),检测神经干细胞 β -连接素的表达,结果显示实验组 β -连接素基因及蛋白均较对照组增高,以干预后第 7 天增高最明显(实验组较对照组增高约 2.3 倍),说明经脉冲强磁场作用后,神经干细胞的 β -连接素的表达在基因及蛋白水平都是增高的。结合前期的研究,脉冲强磁场(0.1 Hz, 4 T, 8 次)有促进神经干细胞增殖的作用,并且在干预后第 7 天,细胞增殖作用最大。可见, β -连接素的表达水平和增殖效应在变化趋势上一致。由此认为,脉冲强磁场作为一种外在刺激因素,作用于神经干细胞后,激活了 Wnt 通路,信号在 Wnt 通路中传递,调节 β -连接素的降解复合体解离,去磷酸化的 β -连接素不被降解,并在胞质内蓄积,进而转入细胞核,与核内转录因子相互作用,启动下游靶基因转录,促进神经干细胞增殖;一定参数下的脉冲强磁场(0.1 Hz, 4 T, 8 次)作用于神经干细胞后,细胞内 β -连接素表达上调,而 β -连接素表达增高又是 Wnt 信号激活的标志,所以,脉冲强磁场(0.1 Hz, 4 T, 8 次)促神经干细胞增殖的机制可能是通过 Wnt/ β -连接素途径介导实现的。

为了更好地揭示脉冲强磁场(0.1 Hz, 4 T, 8 次)促神经干细胞增殖的机制,下一步有必要通过基因干扰或敲除等技术手段,阻断 β -连接素的表达,验证其在细胞增殖中的调控作用;其次,脉冲强磁场毕竟不同于普通的磁场,在这种高场强的极端条件下,神经干细胞的生物学特性是否发生改变、有无恶变风险等问题,均有待于更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Li Q, Michaud M, Canosa S, et al. GSK-3 β : a signaling pathway node modulating neural stem cell and endothelial cell interactions. *Angiogenesis*, 2011, 14:173-185.
- [2] Ng J. Wnt/PCP proteins regulate stereotyped axon branch extension in *Drosophila*. *Biologists*, 2012, 139:165-177.
- [3] Meng D, Xu T, Guo F. The effects of high-intensity pulsed electromagnetic field on proliferation and differentiation of neural stem cells of neonatal rats in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technol: Med Ed*, 2009, 29:732-736.
- [4] Shi L, Li C, Xu T. Study of the effects of high-intensity pulsed electromagnetic stimulation on proliferation of neural stem cells of neonatal rat in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Ed*, 2012, in press.
- [5] Willert K, Brown JD, Danenberg E, et al. Wnt Proteins are lipid modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 2003, 423:448-452.
- [6] Chenn A, Walsh CA. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*, 2002, 297:365-369.
- [7] Araki M, Suzuki H, Layer P. Differential enhancement of neural and photoreceptor cell differentiation of cultured pineal cells by FGF-1, IGF-1, and EGF. *Dev Neurobiol*, 2007, 67: 1641-1654.
- [8] 许涛, 饶耀剑, 郭风劲, 等. 磁刺激对大鼠离体神经干细胞生长和分化的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:129-132.
- [9] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29:2002-2007.
- [10] Baharvand H, Mehrjardi N, Hatami M, et al. Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition. *Int J Dev Biol*, 2007, 51:371-378.
- [11] Daniels DL, Eklof Spink K, Weis WI. Beta-catenin: molecular plasticity and drug design. *Trends Biochem Science*, 2001, 26:672-678.
- [12] Huang H, He X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20:119-125.
- [13] Beyer C, Schramm A, Akhmetshina A, et al. β -catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71:761-767.
- [14] Brvia V, Gradl D, Schamborny A, et al. Beta-catenin is a necessary component of Wnt/beta-catenin signaling in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104:6690-6695.
- [15] Brembeck FH, Rosario M, Birchmeire W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16:51-59.

(修回日期:2012-10-06)

(本文编辑:乔 致)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部 1988 年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部 1998 年颁布的《医学实验动物管理实施细则》,《中华物理医学与康复杂志》对论文中有关实验动物的描述,要求写清楚以下事项:①品种、品系及亚系的确切名称;②遗传背景或其来源;③微生物检测状况;④性别、年龄、体重;⑤质量等级及合格证书编号;⑥饲养环境和实验环境;⑦健康状况;⑧对实验动物的处理方式。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体(SPF)级;四级为无菌级。卫生部课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。