

· 基础研究 ·

磁刺激对大鼠离体神经干细胞生长和分化的影响

许涛 郭风劲 郭铁成 陈安民

【摘要】目的 观察磁刺激对离体新生大鼠神经干细胞生长和分化的影响。**方法** 利用无血清培养技术,从新生大鼠脑室下区分离培养神经干细胞。将神经干细胞置于 0.5 Hz,刺激强度分别为 0.48 T(25% 最大输出,B 组)、0.95 T(50% 最大输出,C 组)和 1.44 T(75% 最大输出,D 组)的条件下进行磁刺激干预,每天 1 次,每次 30 个脉冲,作用 3 d,同时设立对照组(A 组),用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞活性(OD 值),并用流式细胞技术检测神经干细胞分化情况。**结果** 磁刺激各组神经干细胞在干预后 24~48 h OD 值较 A 组稍低($P < 0.05$),至 72 h 后可恢复至 A 组水平;流式结果显示磁刺激各组神经丝蛋白(NF)阳性细胞比例均高于 A 组,其中 D 组 NF 阳性神经元的比例最高($P < 0.05$)。**结论** 0.5 Hz 磁刺激对神经干细胞增殖有一过性的轻度抑制作用,有利于神经干细胞向神经元方向的分化。

【关键词】 磁刺激; 神经干细胞; 增殖; 分化

Effects of magnetic stimulation on proliferation and differentiation of neural stem cells of neonatal rat in vitro XU Tao*, GUO Feng-jin, GUO Tie-cheng, CHEN An-min. * Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of magnetic stimulation (MS) on proliferation and differentiation of neonatal rat neural stem cell in vitro. **Methods** Neural stem cell derived from neonatal rat were exposed to MS (0.5Hz, 0.48T; 0.5Hz, 0.95T; and 0.5Hz, 1.44T, respectively) once daily for 3 days. Thirty pulses of MS were delivered each time. The sham exposure controls were correspondingly established. Inverted phase contrast microscope was used to observe the cultured cell, MTT assay was applied to detect the activity of the cells as expressed by OD value, and flow cytometry was used to detect the results of cell differentiation. **Results** Although OD value of neural stem cell in all the MS groups were significantly less than that in control group 24 to 48 hours post MS, indicating a slightly restraint of the growth of neural stem cell, it reverted to the level of the control at 72 hours, the differences among the MS groups were not significant. The rates of neurofilament-positive neurons revealed by flow cytometry in MS groups were higher than that in control group, and which was the highest in MS of 0.5Hz, 1.44T ($P < 0.05$). **Conclusion** Magnetic stimulation slightly restrained the growth of neural stem cell and could promote of differentiation the rat neural stem cell into neuron-like cell in vitro.

【Key words】 Neural stem cell; Magnetic stimulation; Cell differentiation; Rat

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)为受损的中枢神经的再生带来希望。关于 NSCs 有众多研究热点^[1], 如:如何在体内、外调控及定向诱导 NSCs 向所需的功能神经元分化、如何激活原位 NSCs 达到自我修复的目的等。磁刺激技术在中枢神经系统疾病诊治中的应用越来越受到人们的关注^[2]。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^[3]。位于中枢神经系统内的 NSCs 具有子代细胞可兴奋性和稳定性的双重电生理特性^[4], 磁刺激对 NSCs 可能的影响及治疗性应用潜能等问题尚未见报道。本研究以磁刺激对大鼠离体 NSCs 进行干预,旨在了解磁刺激对 NSCs 体外生长、分化的影响,为磁刺激在神经系统疾病

中的治疗性应用和安全性研究提供实验依据。

材料和方法

一、材料

体外培养第 3 代新生 Wistar 大鼠 NSCs(自制)、DMEM/F12(1:1)、B27、人碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(上述均为 Gibco 公司产品)、胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所)、兔抗巢蛋白 Nestin 单克隆抗体(CHEMICON 公司产品)、鼠抗 NF 单克隆抗体(Neo Markers 公司产品)、兔抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体(Neo Markers 公司产品)、羊抗鼠异硫氰酸荧光黄(fluoresceinisothiocyanate, FITC)荧光二抗(KPL 公司)、羊抗兔罗丹明荧光二抗(KPL 公司)以及二氧化碳培养

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医学科(许涛、郭铁成),骨科(郭风劲、陈安民)

箱、倒置显微镜、荧光显微镜、ELX-800UV 型酶标测试仪、流式细胞仪、磁刺激器(Dantec 公司,丹麦)。

二、方法

利用无血清培养技术从新生大鼠脑室下区分离培养 NSCs^[5],用细胞免疫荧光染色鉴定 NSCs 和子代细胞(图 1~3)。

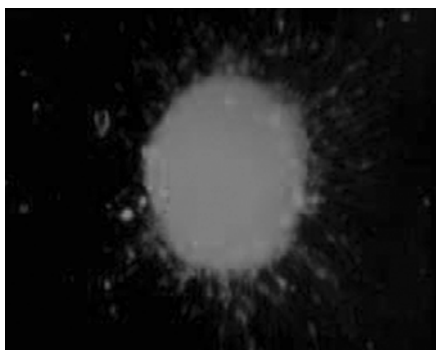


图 1 细胞贴壁 24 h 时的巢蛋白 nestin(罗丹明荧光染色, ×100)

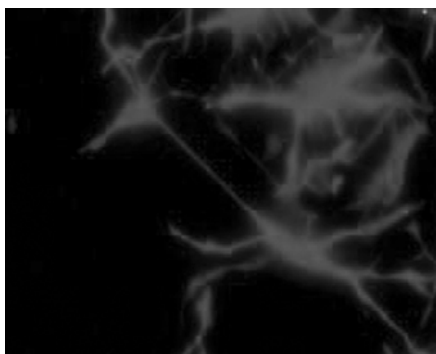


图 2 神经干细胞诱导分化第 7 天时的胶质纤维酸性蛋白(罗丹明染色, ×400)

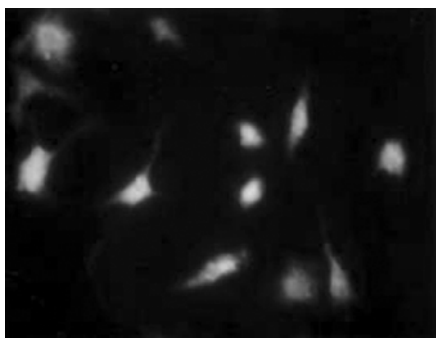


图 3 神经干细胞诱导分化第 7 天时的神经丝蛋白(FITC 荧光染色, ×200)

将培养的第 3 代 NSCs 制成单细胞悬液,分装在 4 个 25 ml 的培养瓶中,分成 4 组按以下方法进行磁刺激干预。将磁刺激线圈水平放在培养瓶中心上方 2 cm 处,频率 0.5 Hz,脉冲刺激波宽为 72 μs,刺激强度 B 组为 0.48 T(25% 最大输出)、C 组为 0.95 T(50% 最大输出)、D 组为 1.44 T(75% 最大输出),每天 1 次,每次给予 30 个脉冲磁刺激,连续刺激 3 d。A 组不进行磁

刺激干预,但每次置于相同的外部环境。4 组均进行以下观察和检测。

1. 细胞生长形态观察: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。

2. 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 μl,加入 MTT 20 μl,继续培养 3~4 h,96 孔板离心去上清,每孔加入 100 μl DMSO,在连续波长酶标仪上测光密度(optical density, OD)值,测定波长为 490 nm 处。MTT 检测重复进行 3 次。根据公式:抑制率 = $(1 - OD_{\text{磁场}} / OD_{\text{对照}}) \times 100\%$,计算不同脉冲磁场对 NSCs 的抑制率。

3. 流式细胞仪检测各组 NSCs 分化成神经元和胶质细胞的比例:磁刺激停止后,各组取细胞接种到预先置有鼠尾胶原涂布盖玻片的 6 孔培养板,加入有血清的培养基(DMEM 培养基,20% 胎牛血清)进行 NSCs 的诱导分化,分别于 3 d、7 d 后行流式细胞检查。用 0.25% 胰酶消化盖玻片上的细胞,D-Hank's 液漂洗,200 g 离心 8 min,4% 多聚甲醛室温固定 30 min,PBS 冲洗。0.5% H₂O₂-甲醇液处理 30 min,1% 牛血清白蛋白-0.3% Triton X-100 37℃ 处理 30 min,加入一抗(NF 1:100; GFAP 1:100)37℃ 孵育 30 min 后,置于 4℃ 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 NF 和 GFAP 各占细胞总数的百分比。

三、统计学分析

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。

结 果

一、各组生长形态观察

干预后 24 h 至第 7 天,A、B、C、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,各组均可见少量已分化细胞与未分化的悬浮生长的干细胞同时存在。在诱导分化后的磁刺激各组与 A 组的培养孔内,已分化的子细胞形态无明显差异(图 4~7)。

二、MTT 比色法测定细胞活力

分别于干预后 24 h、48 h、72 h 及 1 周测得各组的 OD 值 $(\bar{x} \pm s)$,见表 1,不同脉冲磁场对 NSCs 的抑制率(表 2)。结果可见,在 A 组,NSCs 呈稳定生长增殖状态;在 B、C、D 组 NSCs OD 值在 24 h 后开始出现下降,至 48 h 至最低,最大抑制率可达 25%(D 组,第 48 小时),然后逐渐回升,至干预后第 7 天,各组 OD 密度值

接近 A 组。经方差分析,B、C、D 各组与 A 组间差异有统计学意义($P < 0.05$),B、C、D 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

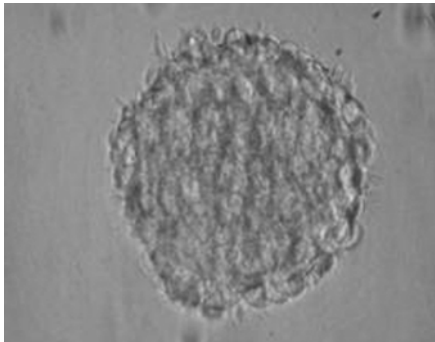


图 4 D 组,磁刺激干预后 24 h,细胞状态良好。胞体圆而透亮,形态规则,未见明显突起($\times 400$)

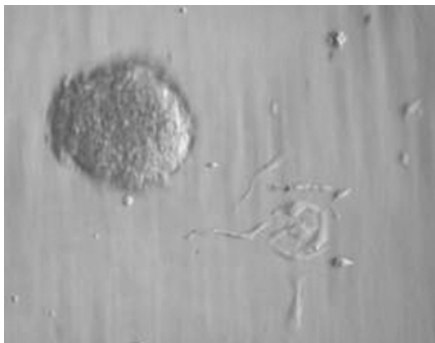


图 5 D 组,克隆球与已分化细胞并存($\times 200$)

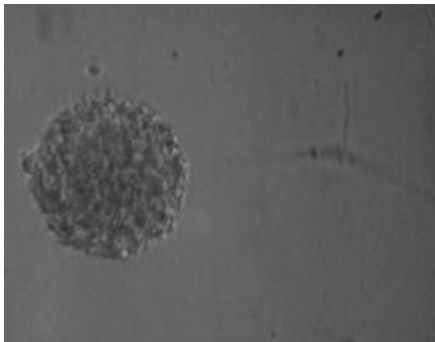


图 6 A 组,克隆球与已分化细胞并存($\times 200$)

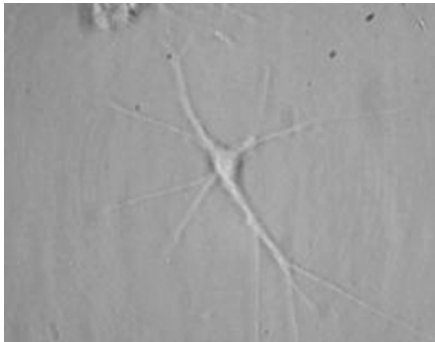


图 7 A 组,诱导第 7 天的已分化细胞($\times 400$)

表 1 神经干细胞光吸收值(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	1 周
A 组	0.353 4 $\pm$ 0.021	0.365 3 $\pm$ 0.072	0.365 4 $\pm$ 0.066	0.368 9 $\pm$ 0.052
B 组	0.336 6 $\pm$ 0.016	0.290 4 $\pm$ 0.036 *	0.306 7 $\pm$ 0.045 *	0.343 3 $\pm$ 0.041
C 组	0.313 2 $\pm$ 0.007 *	0.286 8 $\pm$ 0.097 *	0.299 8 $\pm$ 0.098 *	0.321 $\pm$ 0.046 *
D 组	0.324 6 $\pm$ 0.007 *	0.272 2 $\pm$ 0.031 *	0.321 1 $\pm$ 0.034 *	0.346 2 $\pm$ 0.053 *

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$

表 2 磁场对神经干细胞生长的抑制率(%)

组别	24 h	48 h	72 h	1 周
B 组	4%	20%	16%	6%
C 组	11%	21%	17%	12%
D 组	8%	25%	12%	6%

三、流式细胞仪检测结果

在 A 组,神经丝蛋白(neurofilament, NF)阳性率为 20% ~ 28%,GFAP 阳性率为 50% ~ 63%。使用脉冲磁场刺激后,干细胞分化为神经元的数目较 A 组增多,星形胶质细胞数量有所减少,其中 D 组诱导神经元分化的作用最强。具体结果见表 3。

表 3 不同磁刺激强度对 NSCs 分化的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 d		7 d	
	NF 阳性	GFAP 阳性	NF 阳性	GFAP 阳性
A 组	25.1 $\pm$ 2.4	56.6 $\pm$ 6.3	23.6 $\pm$ 4.3	60.8 $\pm$ 3.7
B 组	31.8 $\pm$ 3.2 *	47.2 $\pm$ 4.5 *	28.4 $\pm$ 4.1 *	55.6 $\pm$ 4.6 *
C 组	32.5 $\pm$ 5.1 *	47.9 $\pm$ 3.6 *	31.2 $\pm$ 3.5 *	53.9 $\pm$ 2.8 *
D 组	39.1 $\pm$ 3.9 *	41.3 $\pm$ 5.3 *	38.8 $\pm$ 4.5 *	42.6 $\pm$ 5.1 *

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$

讨 论

一、磁刺激对 NSCs 生长增殖的影响

实验证明,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^[6-8]。从磁场类型来看,在平均有效强度相同的情况下,脉冲磁场瞬时能量较高,能量的变化较快,可以增大细胞内磁通量的变化,所以脉冲磁场的细胞磁生物效应更强^[9]。其次,磁场强度与细胞生长增殖有关^[10],高强度的磁场可能对细胞生长有破坏作用。最后,关于作用时间,1987 年 WHO 报告短程受磁量在 2 T 以下没有任何不良效应^[11]。另外,不同种类、大小的细胞对脉冲磁场的承受程度也不同,癌细胞比正常细胞敏感,悬浮培养的细胞比贴壁细胞易于破碎,细胞体积大,易被脉冲磁场破坏^[12]。基于上述几方面考虑,加之磁刺激是一种脉冲磁场、强度高,NSCs 呈悬浮生长等原因,本实验中主要研究磁刺激对 NSCs 生长有无明显破坏作用。

结合临床和 Dantec 磁刺激器的性能,本实验中选用了频率为 0.5 Hz 的 3 个刺激强度。经形态学观察,该参数的磁刺激对 NSCs 的生长形态无明显影响;MTT

法对细胞活力的检测结果发现, NSCs 仅在干预后 24~48 h 呈现一过性的生长抑制, 随着时间推移, 这种抑制状态可以逐渐恢复正常, 均提示 NSCs 对这种参数的脉冲磁刺激承受能力较强。

二、磁刺激对 NSCs 分化的影响

NSCs 的神经元向分化因其在细胞替代和基因治疗中的潜能而备受关注。目前的 NSCs 分化研究主要侧重于化学性因素的作用, 但仍未取得共识性研究结论^[13-15], 物理性因素的作用报道不多。李怡等^[16]研究提示, 5 Hz 和 20 Hz 正弦交变磁场 (8 mT) 可以促进 NSCs 向神经元方向定向分化。本实验的结果提示, 磁刺激对 NSCs 生长有一过性的轻度抑制作用, 但在抑制作用已经逐渐解除后的第 3 天和第 7 天, B、C、D 各组神经元向分化的比例大于 A 组, 提示磁刺激有利于 NSCs 向神经元方向的分化, 这在 D 组表现得最为突出。作为一种物理因子, 磁刺激的上述作用可能与以下几种因素有关: ① NSCs 在电生理学上具有子代细胞的双重特性, 磁刺激诱导细胞内产生感应电流, 在重复刺激下, 促使 NSCs 向兴奋性高的神经元向的子细胞分化; ② NSCs 在增殖和分化中主要有对称性分裂和非对称性分裂两种方式^[13], 对干细胞分裂的影响将直接影响到其分化和增殖的状态。受磁场中洛伦兹力的影响, 细胞内的带电粒子的正常运动轨迹受到干扰, 从而影响细胞的分裂过程^[12]; ③ 目前认为决定 NSCs 定向分化的机制中, 细胞自身的调控是最重要的机制之一^[17], 对蛋白或酶活性的效应可能是磁刺激促进 NSCs 分化的最重要的环节, 磁场可以引起细胞内带有不同电荷基团的大分子 (如酶) 构象发生改变, 从而导致酶活性的改变^[12]。

参 考 文 献

- Okano H. Stem cell biology of the central nervous system. J Neurosci Res, 2002, 69:698-707.
- 刘洪广, 周琳, 顾靖, 等. 中枢神经的无创性磁刺激技术及其应

- 用. 生物医学工程学杂志, 2001, 18:169-172.
- Barker AT. An introduction to the basic principles of magnetic nerve stimulation. J Clin Neurophysiol, 1991, 8:26.
- 刘喆, 王红云, 何乐. 胚胎大鼠神经干细胞电生理特性检测. 中华神经外科杂志, 2001, 17: 271-274.
- 李敏杰, 刘勇, 吕海侠, 等. 新生大鼠神经干细胞的分离培养与观察. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18: 316-319.
- Bassett CA. Beneficial effects of electromagnetic fields. J Cell Biochem, 1993, 51: 387-393.
- Raylman RR, Clavo AC, Wahl RL. Exposure to strong static magnetic field slows the growth of human cancer cells in vitro. Bioelectromagnetics, 1996, 17:358-363.
- 冯旭阳, 贾国良, 赵新国. 不同强度恒磁场对人脐动脉平滑肌细胞增殖的影响. 心脏杂志, 2002, 14:113-115.
- 李昌敏, 姜槐, 付一提, 等. 脉冲磁场对细胞缝隙连接通讯功能影响的研究. 中国生物医学工程学报, 2001, 20: 148-151.
- 鲁勇军, 余汪. 磁场生物学效应研究进展. 基础医学与临床, 1994, 14: 329-335.
- Chokroverty S, Hening W, Wright D, et al. Magnetic brain stimulation: safety studies. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1995, 97: 36.
- 张小云, 张维德, 卢丽. 磁场的细胞效应研究. 基础医学与临床, 1994, 14: 335-339.
- Johe KK, Hazel TG, Muller T, et al. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. Genes Dev, 1996, 10: 3129-3140.
- Arsenijevic Y, Weiss S. Insulin-like growth factor I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors; Distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. J Neurosci, 1998, 18:2118-2128.
- Gaiano N, Fishell G. Transplantation as a tool to study progenitors within the vertebrate nervous system. J Neurobiol, 1998, 36: 152-161.
- 李怡, 赵仑, 邢萱, 等. 5 Hz 和 20 Hz 磁场对神经干细胞分化的影响. 航天医学与医学工程, 2002, 15: 374-376.
- Hitoshi S, Alexon T, Tropepe V. Notch pathway molecules are essential for the maintenance but not the generation of mammalian neural stem cells. Genes Dev, 2002, 16:846-858.

(修回日期:2004-12-24)

(本文编辑:郭正成)

· 短篇论著 ·

胰腺假性囊肿的物理治疗

邵秀芹 聂萍萍

胰腺假性囊肿 (pancreatic pseudocyst, PPC) 是急性胰腺炎的常见并发症之一, 临床对直径 > 6 cm 的囊肿多采用手术治疗, 我们在内科治疗的基础上, 联合应用物理因子治疗 PPC, 取得满意疗效。现报道如下。

一、资料与方法

共选取 40 例 PPC 患者, 均由 B 超或 CT 确诊, 并在其体表标识囊肿位置。本组患者中, 男 22 例, 女 18 例; 年龄 20~65 岁, 平均 40.16 岁; 均有急、慢性胰腺炎病史; 患者从发病到确诊的时间为 5~8 周; 临床表现包括: 上腹部包块 40 例, 牵涉痛 25 例, 黄疸 8 例, 腹胀 32 例, 腹水 2 例, 消瘦 10 例。将上述患