

· 基础研究 ·

重复磁刺激对体外培养大鼠神经干细胞分化和凋亡的影响

柳华 韩肖华 陈红 黄晓琳

【摘要】 目的 探讨重复磁刺激(rMS)对体外培养大鼠神经干细胞(NSCs)分化和凋亡作用的影响。**方法** 选取新生 3 d 内的 SD 大鼠乳鼠双侧海马组织悬浮培养 NSCs。在分化培养基下,将 NSCs 单细胞悬液进行贴壁诱导分化后,分为空白对照组和 rMS 组。空白对照组为自然分化无特殊处理,rMS 组刺激参数为频率 10 Hz、50%最大输出强度、每日 1000 个脉冲、共刺激 7 d。rMS 组最后 1 次干预后 1 h 内收集 2 组细胞进行免疫荧光染色分析分化神经元的比例,采用免疫印迹法(Western blotting)检测胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、 β -微管蛋白 3(β -III tubulin)以及脑源性神经营养因子(BDNF)的表达量。再将分化 7 d、无 rMS 干预的 NSCs 诱导凋亡,分为诱导凋亡组和诱导凋亡 rMS 组。诱导凋亡 rMS 组在诱导凋亡 1 h 后进行 rMS 干预,刺激参数同上,诱导 4 h 后收集细胞,通过流式细胞仪检测早期和晚期凋亡率,采用 Western blotting 检测凋亡相关蛋白(Caspase-3、Bcl-2、Bax)的表达量。**结果** rMS 干预 7 d 后 NSCs 分化为神经元的比例无显著性变化($P>0.05$), β -III tubulin、GFAP、BDNF 相对表达量无显著性变化($P>0.05$)。诱导凋亡 rMS 组的细胞凋亡率(9.14 ± 4.72)%与诱导凋亡组的细胞凋亡率(15.38 ± 4.55)%比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。诱导凋亡 rMS 组的 Caspase-3、Bcl-2、Bax 相对蛋白表达量与诱导凋亡组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 频率 10 Hz、干预 7 d 的 rMS 对体外培养大鼠 NSCs 的分化无显著影响,但能减少诱导凋亡剂下神经细胞的凋亡,对神经细胞具有保护作用。

【关键词】 重复磁刺激; 神经干细胞; 凋亡; 分化

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071601,81171858);湖北省教育厅青年科研项目(Q20144104)

The effects of repetitive magnetic stimulation on differentiation and apoptosis of neural stem cells in vitro

Liu Hua, Han Xiaohua, Chen Hong, Huang Xiaolin. Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: Huang Xiaolin, Email: xiaolinh2006@126.com

【Abstract】 Objective To study any effect of repetitive magnetic stimulation (rMS) on the differentiation and apoptosis of rat neural stem cells in vitro. **Methods** The bilateral hippocampus of a 3-day old Sprague-Dawley rat was used to culture neural stem cells (NSCs) in vitro. P2 NSCs were differentiated to neurons or astrocytes in differentiation medium and then divided into a control group in which the NSCs differentiated naturally, and an rMS group in which 1000 impulses/day of rMS were applied at 10 Hz once a day for 7 days at 50% of maximum output. One hour after the last stimulation, immunofluorescence was used to analyze the ratio of neurons and astrocytes, and Western blotting was employed to evaluate the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), β -III tubulin and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). NSCs which had differentiated for 7 days without stimulation were then selected and divided into an apoptosis group and an apoptosis+rMS group. The same rMS protocol was applied to the latter group 1h after the apoptosis, and 4h later flow cytometry (anexin V-FITC) was employed to evaluate the apoptosis ratio. Bcl-2, Bax and caspase-3 protein expression were analyzed using Western blotting. **Results** There were no significant differences between the control and rMS groups in the proportion of NSCs differentiating to neurons or in β -III tubulin, GFAP or BDNF protein expression. The cell apoptosis rate of the apoptosis+rMS group was significant lower than in the apoptosis group. Caspase-3, Bcl-2 and Bax protein expression were also significantly different between the two groups. **Conclusion** rMS at 10Hz for 7 days has no effect on the differentiation of NSCs, but it has a protective effect on neural cells and decreases the apoptosis rate.

【Key words】 Repetitive magnetic stimulation; Neural stem cells; Apoptosis; Differentiation

Fund program: Project supported by the National Natural Science Foundation of China (81071601, 81171858);

Project supported by the Science Foundation for Young Scholars of Hubei provincial Department of Education (20144104)

重复经颅磁刺激 (repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS) 广泛应用于神经科学领域。自 1995 年 George 等^[1]采用 rTMS 治疗抑郁症患者开始已有 20 年。有较多研究通过正电子发射计算机断层显像 (positron emission tomography, PET)^[2]、功能性磁共振成像 (functional magnetic resonance imaging, fMRI)^[3]、脑电图 (electroencephalograph, EEG)^[4] 等方法证实磁刺激可对大脑皮质功能产生影响, 可能与其产生的磁场在大脑皮质和皮质下组织中形成内生电流有关^[5-7]。动物实验研究发现, rTMS 可刺激大鼠神经细胞提高长时程增强 (long-term potentiation, LTP)、抗凋亡、促神经再生水平^[8-10]。但是 rTMS 对神经细胞再生或凋亡之影响的体外实验尚鲜见报道。本研究通过体外培养神经干细胞 (neural stem cells, NSCs), 在分化过程中进行重复磁刺激 (repetitive magnetic stimulation, rMS) 干预, 检测 NSCs 的分化趋势和抗凋亡作用以及 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白的表达水平, 为 rTMS 促神经再生或者抗凋亡作用提供体外实验证据。

材料和方法

一、实验材料

(一) 实验动物

选取新生 3 d Sprague-Dawley (SD) 大鼠乳鼠, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

(二) 主要仪器和材料

CCY-I 型 rTMS 仪 (武汉依瑞德公司), 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, DMEM/F12) (美国 Gibco 公司), B-27[®] Supplement (美国 Invitrogen 公司), B-27[®] Supplement without vitA (美国 Invitrogen 公司), 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, b-FGF) (美国 Peprotech 公司), 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) (美国 Peprotech 公司), 胎牛血清 (fetal calf serum, FBS) (杭州四季青生物公司), TrypLE[™] Express Enzyme (1X) (美国 Gibco 公司), 多聚赖氨酸 (美国 sigma 公司), 小鼠抗胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) (美国 CST 公司), 兔抗 β -微管蛋白 3 (β -III tubulin) (美国 CST), 山羊抗兔异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) (美国 Jackson Immuno Research 公司), CY3 标记山羊抗小鼠 IgG (美国 Proteintech 公司), Caspase-3 抗体 (美国 Santa Cruz 公司), Bcl-2 抗体 (美国 Santa Cruz 公司), Bax 抗体

(美国 Bioworld 公司), 脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 抗体 (美国 Santa Cruz 公司), β -actin 抗体 (武汉博士德公司), 细胞凋亡阳性对照试剂盒 (上海碧云天生物技术公司), AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司)。

(三) 主要试剂的配制

1. 100 ml 增殖培养基配置方法: 取 DMEM/F12 培养基 98 ml、不含维生素 A 的 B-27[®] 2 ml、b-FGF 2 μ g 和 EGF 2 μ g, 在超净台内用 0.22 μ m 过滤器除菌后加入无菌 DMEM/F12 培养基中混匀、封口, 放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2. 100 ml 1% FBS 分化培养基配置方法: 取 DMEM/F12 培养基 97 ml、含维生素 A B-27[®] 2 ml、FBS 1 ml, 在超净台内用 0.22 μ m 过滤器除菌, 放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

二、实验方法

1. NSCs 悬浮培养方法: 将新生 3 d 内 SD 大鼠乳鼠浸入 75% 乙醇中消毒 30 s, 快速分离出双侧海马组织置于预冷培养基中剪碎。经 1 ml 枪头吹打、200 目滤网过滤后离心, 离心半径 8 cm, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 200 μ l 枪头重悬细胞, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 静置培养, 每 5 d 传代 1 次。收集第 2 代悬浮神经球, 用 TrypLE[™] Express 在 37 $^{\circ}$ C 消化 2 min, 600 r/min 离心 5 min 后弃上清, 用 200 μ l 枪头吹打若干次成 NSCs 单细胞悬液。

2. NSCs 贴壁分化培养方法: 用多聚赖氨酸包被培养瓶或培养皿。调整 NSCs 单细胞悬液密度为 1×10^4 /ml, 接种于包被过的培养瓶或培养皿, 每 2~3 d 换新鲜分化培养基。

3. 分化干预方法: 贴壁分化的 NSCs, 培养 12 h 后开始进行 rMS, 每隔 24 h 1 次, 连续刺激 7 d。7 d 后用冰甲醇固定 20 min, 放入 -40 $^{\circ}$ C 环境中保存。

4. 凋亡干预方法: 贴壁分化的 NSCs 自然分化 7 d 后, 加入细胞凋亡诱导试剂 A (1 : 1000) 1 h 后进行 rMS 干预 1 次, 3 h 后用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化细胞进行 Annexin-V/PI 染色, 在流式细胞仪上分析凋亡情况。

5. 实验分组: ①将 NSCs 贴壁培养后分为空白对照组 (自然分化无任何处理) 和 rMS 组 (给予 rMS 刺激); ②将自然分化 7 d 后的 NSCs 分为诱导凋亡组 (用细胞凋亡阳性对照试剂盒诱导凋亡) 和诱导凋亡 rMS

组(诱导凋亡后 1 h 进行 rMS 干预)。

6. 干预方法:将 rMS 组培养皿置于“8”字形刺激线圈的交叉中心(图 1)。刺激参数:频率 10 Hz, 50% 最大输出量(最大输出量 3.5 T), 50 个脉冲, 重复序列 20 次, 序列刺激间隔时间为 10 s。



图 1 培养皿放置位置

7. 细胞免疫荧光染色检测分化的神经元比率:取出冻存的细胞爬片,用 0.01 M 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)摇床充分洗涤后,用 0.1% 的 Triton-X100-PBS 透膜 15 min,充分洗涤后加正常山羊血清常温封闭 1 h。GFAP(1:200)和 β -III tubulin(1:200)一抗按比例混合稀释,爬片洗涤后 4℃ 湿盒孵育过夜。洗涤后将两种二抗混合孵育避光室温孵育 1 h,洗涤 3 次,每次 10 min。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色 15 min, 50%甘油封片。采用正置荧光显微镜采集图像并进行分析,每张图片随机选取 5 个视野,重复 3 次。

8. 流式细胞仪检测凋亡率:用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化分化 7 d 的神经细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 2000 r/min 离心 5 min, 离心半径 8 cm, 每管收集 $(1 \sim 5) \times 10^5$ 个细胞。加入 500 μ l Binding Buffer 悬浮细胞、5 μ l Annexin-V-FITC 后混匀,再加入 5 μ l 碘化丙啶(propidium iodide, PI)混匀,室温避光 15 min 后上机检测。激发波长 $E_x = 488$ nm, 发射波长 $E_m = 530$ nm。凋亡率 = $UL(Q2) + LR(Q4)$, $UL(Q2)$ 为上左象限表示晚期凋亡情况, $LR(Q4)$ 为上右象限表示早期凋亡情况。

9. 免疫印迹法(Western Blotting)分析:提取空白对照组和 rMS 组、诱导凋亡组和诱导凋亡 rMS 组的蛋白总量,取 50 μ g 总蛋白上样进行电泳。 β -III tubulin 转膜电流 200 mA, 时间 120 min; GFAP 转膜电流 200 mA, 时间 120 min; BDNF 转膜电流 200 mA, 时间 30 min; Caspase-3 转膜电流 200 mA, 时间 90 min; Bax、Bcl-2 转膜电流 200 mA, 时间 50 min。用含 5% 脱脂奶粉的洗涤液(tris-buffered saline and tween, TBST)浸泡

摇床,室温封闭 2 h。一抗 β -III tubulin(1:1000)、GFAP(1:200)、BDNF(1:200)、Caspase-3(1:200)、Bax(1:1000)、Bcl-2(1:200) 4℃ 孵育过夜(16 h)。经 TBST 充分洗涤后,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗(1:50 000)室温摇床孵育 2 h。TBST 洗涤后显色曝光。采用 Gene Genius Bio-Imaging system 凝胶成像仪采集图像,用 BandScan 软件分析光密度信号条带。

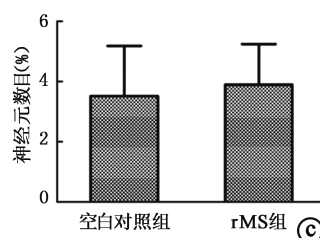
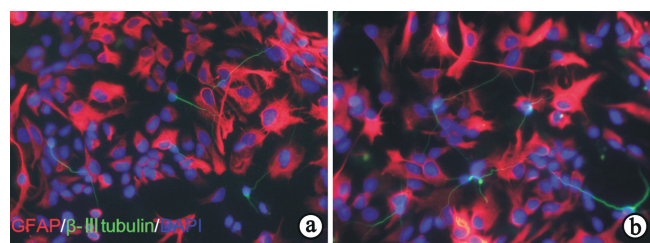
三、统计学方法

采用 SPSS 17.0 版统计学软件包对数据进行分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 形式表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、NSCs 分化 7 d 后的神经元比例

用免疫荧光双标染色后,红色荧光 GFAP 为星形胶质细胞的标志物蛋白,胞浆着色,细胞呈平铺,胞体分支多。绿色荧光 β -III tubulin 为神经元细胞的标志物蛋白,胞浆着色,有多个细长细胞突起。细胞核均呈蓝色荧光的椭圆形(DAPI 染色)。NSCs 分化 7 d 后镜下统计神经元细胞的数量, rMS 组 $(3.90 \pm 1.35)\%$ 与空白对照组 $(3.51 \pm 1.67)\%$ 比较无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 2。



注:a、b 分别为空白对照组和 rMS 组 GFAP(红色荧光)和 β -III tubulin(绿色荧光)的双标荧光染色图;c 为数据统计图
图 2 rMS 干预下 NSCs 分化 7 d 后的神经元比例比较(免疫组化染色, $\times 400$)

二、GFAP、 β -III tubulin 和 BDNF 蛋白的表达水平

细胞成分 GFAP、 β -III tubulin 蛋白在分化干预 7 d 后,空白对照组和 rMS 组的 GFAP 蛋白相对表达量分别为 (0.389 ± 0.068) 、 (0.310 ± 0.127) , 差异无统计学意义($P > 0.05$)。空白对照组和 rMS 组的 β -III tubulin 蛋白相对表达量分别为 (0.441 ± 0.175) 、 (0.436 ± 0.089) , 差异无统计学意义($P > 0.05$)。BDNF 有促进神经元分化的作用,空白对照组和 rMS 组的 BDNF 蛋白相对表达量分别为 (0.200 ± 0.192) 、 (0.276 ± 0.105) , 差异无统

计学意义($P>0.05$)。详见图 3。

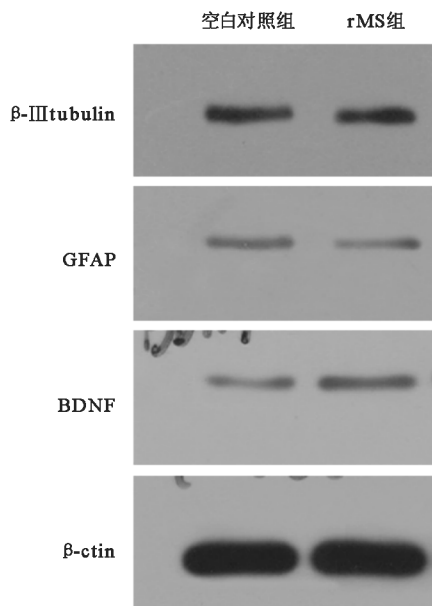


图3 空白对照组和 rMS 组 GFAP、 β -III tubulin 及 BDNF 蛋白的表达水平

三、rMS 和诱导凋亡下的流式凋亡率比较

本研究的凋亡率为早期和晚期凋亡率(Q2+Q4)的总和。通过流式分析发现,诱导凋亡 rMS 组的凋亡率($9.14 \pm 4.72\%$)较诱导凋亡组凋亡率($15.38 \pm 4.55\%$)显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。详见图 4。

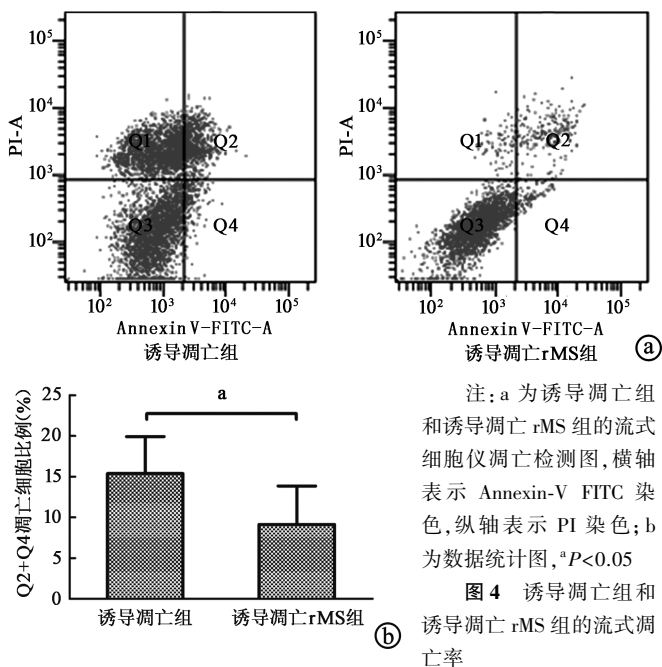


图4 诱导凋亡组和诱导凋亡 rMS 组的流式凋亡率

四、诱导凋亡后 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达水平

Caspase-3 蛋白活化时,被剪切成 19 kD (Caspase-

3-1) 和 17 kD (Caspase-3-2) 两个小蛋白发挥作用。分化的 NSCs 经诱导凋亡剂诱导 3 h 后,诱导凋亡 rMS 组凋亡相关蛋白 Caspase-3-1 (0.031 ± 0.017) 和 Caspase-3-2 (0.059 ± 0.038) 的表达水平较诱导凋亡组 Caspase-3-1 (0.051 ± 0.024) 和 Caspase-3-2 (0.094 ± 0.024) 的表达水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。诱导凋亡 rMS 组 Bcl-2 蛋白表达水平 (0.105 ± 0.055) 与诱导凋亡组 Bcl-2 蛋白表达水平 (0.080 ± 0.006) 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。诱导凋亡 rMS 组 Bax 蛋白的表达水平 (0.115 ± 0.059) 与诱导凋亡组 Bax 蛋白的表达水平 (0.172 ± 0.118) 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。详见图 5。

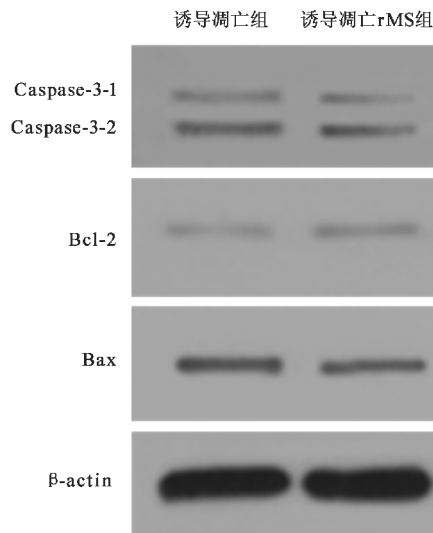


图5 诱导凋亡组和诱导凋亡 rMS 组凋亡相关蛋白的表达水平

讨 论

本研究观察了 rMS 对体外培养大鼠 NSCs 分化及凋亡的影响,结果发现 rMS 对 NSCs 的分化趋势无明显影响,但对诱导凋亡分化的神经细胞有抗凋亡作用,提示抗神经细胞凋亡是 rMS 的主要治疗作用之一。

rMS 具有显著的临床疗效而被广泛应用^[11-13],但其具体治疗机制尚不清楚。有研究报道,rMS 的刺激频率、强度、刺激时间、刺激量以及线圈形状都是疗效的重要影响因素^[14]。其中有关频率的研究最为广泛。临床实验发现,10 Hz 的高频 rTMS 有促兴奋作用^[15-16],1 Hz 的低频 rTMS 有抑制作用^[17-18]。有研究用 1 Hz 和 10 Hz 的 rTMS 分别刺激海马脑片,结果发现 Zif268 基因只在刺激频率为 10 Hz 时有显著表达,并与 LTP 的变化具有一致性,而 1 Hz 的 rTMS 会在一定程度上损伤认知功能^[19-20]。因此,本研究选择 10 Hz 作为刺激频率。

神经再生过程分为 NSCs 增殖、迁移和分化。研

究表明, rTMS 可促进脑缺血大鼠室管膜下区 (sub-ventricular zone, SVZ) NSCs 的增殖^[21]。但 rTMS 是否能促使增殖干细胞分化为神经元细胞尚不清楚。GFAP 为星形胶质细胞的标志物, β -III tubulin 为早期神经元细胞的标志物。本研究发现, 体外 rMS 干预 7 d 对 NSCs 分化没有明显影响。rMS 干预后 GFAP、 β -III tubulin 的蛋白表达水平也无明显差异。说明 rMS 对 1%FBS 下诱导分化的 NSCs 分化方向无显著影响。研究还发现, rMS 干预 7 d 后 BDNF 蛋白的表达水平虽有上升趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。BDNF 是一种神经营养蛋白质, 是神经营养因子家族成员之一, 主要参与大脑的学习和记忆过程, 对神经元的生长发育、存活、分化及修复有重大意义^[22]。有研究表明, 无论刺激频率是高频还是低频, 研究对象是健康还是患病, rTMS 均可促使脑组织分泌 BDNF, 改善研究对象的行为学表现^[23-25]。本研究可能由于干预时间较短, 仅为 7 d, 所以 BDNF 变化不明显, 从而导致分化的神经元数量之间无统计学差异, 需进一步研究验证。

有研究报道, NSCs 增殖和分化可能与 rMS 抗凋亡作用相关^[9]。本研究采用 rMS 干预 NSCs 自然分化 7 d 的细胞, 观察其对 NSCs 的抗凋亡作用。结果发现在诱导凋亡剂下, rMS 干预后的分化细胞早期和晚期凋亡率 (Q2+Q4) 显著下降, 说明 10 Hz 的 rMS 可改善诱导的细胞凋亡, 对细胞起到保护效应。正常情况下 NSCs 处于静息状态, 当发生癫痫、脑外伤、脑缺血时, 内源性的 NSCs 受到内环境刺激会增殖、迁徙和分化^[26-27]。当分化的神经元整合到神经网络中并具有功能时, 脑部疾病在很大程度上可得到改善。但实际上 NSCs 最终存活很少。脑卒中 28 d 后, 90% 的再生神经细胞都会凋亡或死亡, 只有 0.2% 的新生神经细胞能够存活超过 5 周^[28]。因此, 提高神经细胞的存活率可能是神经功能恢复的关键因素。本研究证实, rMS 可促进再生神经细胞存活, 减少凋亡。rMS 干预后, 凋亡相关蛋白 Caspase-3 水平下调, 凋亡调节因子 Bcl-2 水平增加, 促凋亡基因 Bax 水平下降。Bcl-2 可抑制 Bax 引起的内源性线粒体途径的凋亡^[29]。同时 Bcl-2 还可以与 Bim 结合, 提高细胞对外界理化因素的耐受能力^[30]。因此, rTMS 的治疗作用可能与降低细胞 Caspase-3 激活水平、提高 Bcl-2/Bax 比例、减少分化神经细胞凋亡数量、增加细胞存活率相关。

综上所述, 10 Hz 的 rMS 体外干预对 NSCs 的分化无明显影响, 但能显著减少诱导凋亡剂下神经细胞的凋亡水平, 提示 rTMS 治疗脑部疾病的潜在机制可能是细胞抗凋亡作用, 而非神经重塑, 这一结论为今后 rTMS 的临床应用提供了新的理论依据和治疗思路。

参 考 文 献

- [1] George MS, Wassermann EM, Williams WA, et al. Daily repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) improves mood in depression[J]. *Neuroreport*, 1995, 6 (14):1853-1856.
- [2] Tougé T, Gerschlagler W, Brown P, et al. Are the after-effects of low-frequency rTMS on motor cortex excitability due to changes in the efficacy of cortical synapses[J]. *Clin Neurophysiol*, 2001, 112 (11): 2138-2145.
- [3] Bilek E, Schäfer A, Ochs E, et al. Application of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation to the DLPFC alters human prefrontal-hippocampal functional interaction[J]. *J Neurosci*, 2013, 33 (16):7050-7056. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3081-12.2013.
- [4] Esser SK, Huber R, Massimini M, et al. A direct demonstration of cortical LTP in humans: a combined TMS/EEG study[J]. *Brain Res Bull*, 2006, 69 (1):86-94.
- [5] Hallett M. Transcranial magnetic stimulation and the human brain[J]. *Nature*, 2000, 406 (6792):147-150.
- [6] Moliadze V, Zhao Y, Eysel U, et al. Effect of transcranial magnetic stimulation on single-unit activity in the cat primary visual cortex[J]. *J Physiol*, 2003, 553 (2):665-679.
- [7] Li W, Yang Y, Ye Q, et al. Effect of chronic and acute low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on spatial memory in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2007, 71 (5):493-500.
- [8] Yoon KJ, Lee YT, Han TR. Mechanism of functional recovery after repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in the subacute cerebral ischemic rat model: neural plasticity or anti-apoptosis [J]. *Exp Brain Res*, 2011, 214 (4):549-556. DOI: 10.1007/s00221-011-2853-2.
- [9] Müller-Dahlhaus F, Vlachos A. Unraveling the cellular and molecular mechanisms of repetitive magnetic stimulation[J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, 6(12):50. DOI: 10.3389/fnmol.2013.00050.
- [10] Ueyama E, Ukai S, Ogawa A, et al. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats[J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2011, 65 (1):77-81. DOI: 10.1111/j.1440-1819.2010.02170.x.
- [11] Bentwich J, Dobronevsky E, Aichenbaum S, et al. Beneficial effect of repetitive transcranial magnetic stimulation combined with cognitive training for the treatment of Alzheimer's disease: a proof of concept study[J]. *J Neural Transm*, 2011, 118 (3):463-471. DOI: 10.1007/s00702-010-0578-1.
- [12] Hsu WY, Cheng CH, Liao KK, et al. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor functions in patients with stroke: a meta-analysis[J]. *Stroke*, 2012, 43 (7):1849-1857. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.649756.
- [13] Leung A, Donohue M, Xu R, et al. rTMS for suppressing neuropathic pain: a meta-analysis. *J Pain*, 2009, 10 (12):1205-1216. DOI: 10.1016/j.jpain.2009.03.010.
- [14] Herbsman T, Forster L, Molnar C, et al. Motor threshold in transcranial magnetic stimulation: the impact of white matter fiber orientation and skull-to-cortex distance[J]. *Hum Brain Mapp*, 2009, 30 (7): 2044-2055. DOI: 10.1002/hbm.20649.
- [15] Poirrier AL, Nyssen Y, Scholtes F, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation improves open field locomotor recovery after low but not high thoracic spinal cord compression-injury in adult rats[J]. *J*

- Neurosci Res, 2004, 75 (2):253-261.
- [16] Sun P, Wang F, Wang L, et al. Increase in cortical pyramidal cell excitability accompanies depression-like behavior in mice; a transcranial magnetic stimulation study [J]. J Neurosci, 2011, 31 (45): 16464-16472. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1542-11.2011.
- [17] Théoret H, Kobayashi M, Valero-Cabré A, et al. Exploring paradoxical functional facilitation with TMS [J]. Suppl Clin Neurophysiol, 2003, 56(1):211-219.
- [18] Antal A, Nitsche MA, Paulus W. Transcranial magnetic and direct current stimulation of the visual cortex [J]. Suppl Clin Neurophysiol, 2003, 56(1):291-304.
- [19] Aydin-Abidin S, Trippe J, Funke K, et al. High- and low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation differentially activates c-Fos and zif268 protein expression in the rat brain [J]. Exp Brain Res, 2008, 188 (2):249-261. DOI: 10.1007/s00221-008-1356-2.
- [20] Ahmed Z, Wieraszko A. Modulation of learning and hippocampal, neuronal plasticity by repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) [J]. Bioelectromagnetics, 2006, 27 (4):288-294.
- [21] Guo F, Han X, Zhang J, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neural stem cell proliferation via the regulation of MiR-25 in a rat model of focal cerebral ischemia [J]. PLoS One, 2014, 9 (10):109267. DOI: 10.1371/journal.pone.0109267.
- [22] Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways [J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4 (4):299-309.
- [23] Wang HY, Crupi D, Liu J, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation enhances BDNF-TrkB signaling in both brain and lymphocyte [J]. J Neurosci, 2011, 31 (30):11044-11054. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2125-11.2011.
- [24] Feng SF, Shi TY, Fan Y, et al. Long-lasting effects of chronic rTMS to treat chronic rodent model of depression [J]. Behav Brain Res, 2012, 232 (1):245-251. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.04.019.
- [25] Ma J, Zhang Z, Su Y, et al. Magnetic stimulation modulates structural synaptic plasticity and regulates BDNF-TrkB signal pathway in cultured hippocampal neurons [J]. Neurochem Int, 2012, 62 (1):84-91. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.11.010.
- [26] Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system [J]. Annu Rev Neurosci, 2005, 28(1):223-250.
- [27] Liu H, Han X, Chen H, et al. Repetitive magnetic stimulation promotes neural stem cells proliferation by upregulating MiR-106b in vitro [J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2015, 35(5):766-772. DOI: 10.1007/s11596-015-1505-3.
- [28] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke [J]. Nat Med, 2002, 8 (9):963-970.
- [29] Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis [J]. J Cell Biol, 1997, 139 (5):1281-1292.
- [30] Dai H, Ding H, Meng XW, et al. Contribution of Bcl-2 phosphorylation to Bak binding and drug resistance [J]. Cancer Res, 2013, 73 (23):6998-7008. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0940.

(修回日期:2015-11-23)

(本文编辑:凌琛)

• 外刊撷英 •

Nintendo wii-based therapy for poststroke rehabilitation

BACKGROUND AND OBJECTIVE After stroke, the recovery of hand function is a factor significantly associated with independence in everyday life. Among treatments for upper extremity rehabilitation, constraint induced movement therapy (CIMT) is among the current best practices. This study compared a commercial videogame, the Nintendo Wii, to CIMT for the treatment of upper extremity function after stroke.

METHODS Subjects were 42 patients with upper extremity limb impairment, three to 12 months post-stroke. The patients were randomized to receive either CIMT or Wii, in a 14-day, dose-matched, assessor-blinded trial. Those in the modified CIMT group agreed to wear the constraint mitt on the less affected hand for up to 90% of waking hours. Therapy included shaping practice, tailored to the patient's motor function. For the Wii group, the controller was used only in the more affected hand to engage in games of golf, boxing, baseball, bowling and tennis. The primary outcome measures were the Wolf Motor Function Test timed-tasks (WMFT-tt) and the Motor Activity Log Quality of Movement scale (MALQOM).

RESULTS Linear mixed model analyses revealed a change in MALQOM score ($P < 0.001$) across all time points and a nonsignificant trend for the WMFT-tt ($P = 0.052$), with improvements persisting at six months. No significant differences were found between the groups on either primary outcome measure. Patients reported high perceived improvement in satisfaction scores, with no difference between groups.

CONCLUSION This study demonstrates that Wii may be as effective as Constraint Induced Movement Therapy for improving motor function of upper extremities after stroke.

【摘自:McNulty PA, Thompson-Butel AG1, Faux SG, et al. Efficacy of wii-based movement therapy for upper limb rehabilitation in the chronic post stroke: a randomized, controlled trial. Int J Stroke, 2015, 10(8): 1253-1260.】