

50Hz 电磁场促进骨髓源神经祖细胞 向神经元分化作用的研究*

李伟坤¹ 白文芳² 许伟成² 白利明² 李新平² 朱洪翔² 张冲³ 李媚慧¹ 刘晓涵³ 张鸣生^{2,4}

摘要

目的:通过分析 50Hz 电磁场干预骨髓源神经祖细胞向神经细胞分化前后相关神经细胞标志物 mRNA 表达水平,探讨低频电磁场对骨髓源神经祖细胞诱导分化的作用。

方法:利用全骨髓培养法获取骨髓间充质干细胞,将第 2 代骨髓间充质干细胞在无血清神经干细胞培养环境中悬浮诱导,获取骨髓源神经祖细胞。将第 3 代骨髓源神经祖细胞分为 2 组贴壁培养:电磁场组与对照组。电磁场组干预方法为正弦波磁场、频率 50Hz、强度 5mT,60min/d,共 15 天,对照组置于无磁场干预的同等环境中。骨髓源神经祖细胞诱导后,采用免疫细胞荧光检测巢蛋白(Nestin)与微管蛋白抗体(Tuj-1)的表达变化;采用实时定量基因扩增荧光检测系统(Q-PCR)检测 Nestin,唾液酸-神经细胞粘附分子(PSA-NCAM)和 β -微管蛋白-III(β -III tubulin),乙酰胆碱酯酶(ACHE),5-羟色胺(5-HT), γ -氨基丁酸(GABA)mRNA 表达水平变化。

结果:骨髓间充质干细胞在无血清神经干细胞培养环境中可形成骨髓源神经祖细胞,表达 Nestin 阳性产物;两组诱导后的神经元样细胞免疫细胞荧光检测 Tuj-1 均呈阳性表达,Q-PCR 结果示 Nestin,PSA-NCAM, β -III tubulin,ACHE,5-HT,GABA mRNA 表达水平与诱导前比较显著下降($P < 0.01$),电磁场组 β -III tubulin mRNA 表达水平显著高于对照组($P < 0.05$)。

结论:50Hz 电磁场可以促进骨髓源神经祖细胞向神经元分化。

关键词 骨髓间充质干细胞;骨髓源神经祖细胞;神经细胞;低频电磁场;分化

中图分类号:R454.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-07-0723-06

50Hz electromagnetic fields facilitate bone marrow stroma cells-derived neural progenitor cells to differentiate into neurons/LI Weikun, BAI Wenfang, XU Weicheng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2016,31(7): 723—728

Abstract

Objective: By analyzing the mRNA expression level of nerve cell markers and neurotransmitters before and after the intervention of 50Hz electromagnetic fields, we investigated the effects of low frequency electromagnetic fields on the differentiation ability of bone marrow-derived neural progenitor cells (BM-NPCs) differentiation ability.

Method: Firstly, bone mesenchymal stem cells (BMSCs) were gained by the whole bone marrow culture method, and the second generation BMSCs were cultured and induced under neural stem cells (NSCs) culture conditions to obtain the BM-NPCs. Secondly, the third generation BM-NPCs were randomly divided into two groups: an electromagnetic field group and a control group. The electromagnetic field group was exposed to

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.07.002

*基金项目:国家青年自然科学基金项目(81301680);广东省科技计划项目(2012B061700059);广东省科技厅科技发展专项资金项目(2016A020214014)

1 暨南大学第一临床医学院,广州,510630; 2 广东省人民医院,广东省医学科学院,广东省老年医学研究所; 3 南方医科大学研究生学院; 4 通讯作者

作者简介:李伟坤,男,硕士研究生; 收稿日期:2015-12-22

a sine wave electromagnetic fields with the frequency of 50Hz and magnetic induction of 5mT, and 60min per day for fifteen days. The control group was treated under the same condition without exposure. After BM-NPCs induced differentiation, the cell marker of Nestin and Tuj-1 were analyzed by immunofluorescence and the mRNA expression of Nestin, PSA-NCAM, β -III tubulin, ACHE, GABA and 5-HT were tested by real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction method.

Result: Under serum-free neural stem cells suspension culture conditions, the BMSCs could be aggregated into BM-NPCs with positive Nestin. After the induction of BM-NPCs, the results of immunofluorescence showed the positive expression of Tuj-1 for neuron-like cells in two groups. After induction, the mRNA expression of Nestin, PSA-NCAM, β -III tubulin, ACHE, GABA and 5-HT was significantly decreased ($P < 0.01$). Furthermore, the β -III tubulin mRNA level in the electromagnetic field group was higher than in the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: 50Hz electromagnetic fields could induce neural progenitor cells differentiation into neurons.

Author's address The First School of Clinical Medicine, Jinan University, Guangzhou, 510632

Key word bone mesenchymal stem cells; bone marrow-derived neural progenitor cells; neurons; low-frequency electromagnetic fields; differentiation

最近研究称低频电磁场在促进骨髓源干细胞向神经细胞分化和保护神经细胞中起到重要作用^[1-3]。我们前期研究^[4]发现,在骨髓间充质干细胞向神经元样细胞或神经胶质细胞样细胞分化时,期间经历“神经球样细胞”这个阶段。目前,大家对这种骨髓源神经球样细胞的生物学特性还不太清楚。前期实验结果提示:50Hz电磁场有助于诱导骨髓源神经元样细胞形成,并通过免疫细胞荧光检测、RT-PCR检测、细胞膜片钳等手段分别观察到骨髓源神经细胞标志物表达,神经营养因子基因表达和动作电位,但电磁场能否起促进巢蛋白(nestin)阳性神经祖细胞定向分化作用,且分化后的神经细胞是否具有递质表达仍不清楚,所以我们尝试通过检测50Hz电磁场诱导骨髓源神经细胞形成后神经细胞标志物和神经递质的基因表达情况,进一步明确低频电磁场在骨髓源神经元的定向分化作用。

1 材料与方法

1.1 骨髓源神经祖细胞的培养

采用全骨髓培养法培养骨髓间充质干细胞,选用第二代骨髓间充质干细胞,按 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于含EGF、bFGF、DMEM/F12的无血清培养基中,置于25ml悬浮培养瓶,37℃,5%CO₂环境中培养。72h后将细胞群离心,用无血清神经干细胞培养基重悬并机械分离成单个细胞或小集落。培养基1周换1次,并且每3天添加1次生长因子bFGF和EGF,

在鉴定及分化前扩增2—4代。定期在倒置显微镜下观察细胞的生长增殖情况。

1.2 骨髓源神经祖细胞神经诱导方案

把骨髓来源的第三代骨髓源神经祖细胞随机分为对照组,磁场组(频率50Hz、强度5mT,1h/d,共15天)。取第三代神经球(直径约70 μm)以每平方厘米20—30个细胞球接种于含有多聚赖氨酸包被的24孔板中,进行诱导分化。加入含EGF、bFGF、胎牛血清白蛋白、Neurobasal培养基的诱导液,在37℃,5%CO₂环境下诱导,每三天时更换诱导液1次,诱导3d后开始观察神经球形态学变化及分化情况。

1.3 分组干预方法

实验用电磁场发生器由暨南大学物理系定制^[4],取第三代骨髓源神经干细胞分为两组:对照组与电磁场组。

1.3.1 对照组:取第三代骨髓源神经祖细胞在含EGF、bFGF、胎牛血清白蛋白、Neurobasal培养基中,37℃,5%CO₂的磁场发生器的环境下诱导15d,磁场发生器处于关闭状态。

1.3.2 电磁场组:取第三代骨髓源神经祖细胞在含EGF、bFGF、胎牛血清白蛋白、Neurobasal培养基中,37℃,5%CO₂的磁场发生器的环境下诱导15d,磁场发生器处于开启状态(频率50Hz、强度5mT,60min/d)。

1.4 免疫细胞荧光检测

1.4.1 骨髓源神经祖细胞免疫细胞荧光检测:取第

三代骨髓源神经祖细胞接种于含多聚赖氨酸包被的24孔板中,待其贴壁后用磷酸缓冲盐溶液(PBS)漂洗3×5min;4%多聚甲醛处理10min,PBS漂洗3×2min;0.3% TxitonX-100 室温孵育20min,PBS漂洗3×5min;3%过氧化氢溶液处理15min,PBS漂洗3×2min;用15%的山羊血清封闭20min,封闭过程置于4℃环境中;加入兔抗大鼠nestin一抗(1:500稀释),阴性对照用PBS代替,置于冰箱内4℃孵育过夜,约16h后,PBS漂洗3×5min;避光加入FITC标记的羊抗兔IgG二抗(1:100稀释),室温孵育60min,阴性对照用正常羊血清代替,PBS漂洗3×5min;DAPI室温复染细胞核20min,PBS漂洗3×4min;中性树胶封片,镜下观察并摄片。一抗及二抗均购自Life Technologies公司及二抗购自Sigma公司。

1.4.2 骨髓源神经祖细胞诱导后免疫细胞荧光检测:取诱导15d时进行免疫荧光染色的分化表型鉴

定,设置对照组,此时一抗为兔抗大鼠Tuj-1(1:400稀释),二抗为FITC标记的羊抗兔IgG二抗(1:100稀释),方法同前。

1.5 定量PCR检测

取诱导前和诱导15d后对照组,磁场组细胞,抽提细胞总RNA,多次操作,取RNA的平均值。按照Takara RNA PCR Kit(AMY)Ver. 3.0说明书操作进行反转录。用RT试剂盒将RNA反转录为cDNA,然后以cDNA的第1条链为模板进行PCR扩增。采用SLAN荧光定量PCR检测系统分析。

Trizol Reagent购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒均购自德国DBI公司。荧光定量PCR仪(SLAN荧光定量PCR检测系统)为AMI公司生产。引物由Invitrogen Biotechnology Co. LTD 中国公司合成。引物合成序列见表1。

表1 引物合成序列

基因	上游引物	下游引物	长度(bp)
nestin	GGACTCAGAACAAGTGAATGGG	CTGTCCCTGTAATAGGAGTTCTTG	106
PSA-NCAM	CAAGTCCCTAGACTGGAACGC	CCTTGGATTTCCTTGCTGGT	71
β-III tubulin	GCATCTCCGAGCAGTTACG	TCCTCGTCGCATCTCATACAT	190
ACHE	CACCGTGCCTCCACATTGACT	CTGTGCGGGCAAAATTGGTC	166
5-HT	ATAGCTGATATGCTGCTGGGTT	AAAGAGCACATCCAGGTAATCC	123
GABA	CCATTGTCCTTCTCCCTCTC	TTTGCTCCACTTCTACAGACC	121
β-actin	CACCCAGCACAATGAAGATCAAGAT	CCAGTTTTTAAATCCTGAGTCAAGC	317

PCR反应条件:预变性95℃ 10min,变性95℃ 15s,退火60℃ 60s,延伸75℃ 2min,共计40个循环。采用比较阈值法表示目的基因的相对表达,即 $\Delta\Delta Ct$ 法:目的基因的相对表达量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct=Ct_{目的基因}-Ct_{\beta-actin}$, $\Delta\Delta Ct=\Delta t_{实验}-\Delta t_{对照组平均值}$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示的是实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数。

1.6 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件包进行处理,结果以均数±标准差表示。统计分析采用单因素方差分析和独立样本t检验。

2 结果

2.1 细胞形态观察

2.1.1 骨髓源神经祖细胞形态学观察:取第三代骨髓间充质干细胞,在无血清的神经干细胞培养基中培养并接种于低粘附性的培养瓶中培养,72h后可

见直径大小不一的细胞聚集成团,处于悬浮状态,可见单细胞围绕细胞球边缘,细胞球透亮度较好。见图1A,图1B。

2.1.2 诱导后神经元样细胞形态学观察:在倒置显微镜下观察,可看到细胞胞体大而圆,胞体周围突起较多,突起末端与周围细胞相连接,立体感强,形态神经元样细胞。见图1C。

2.2 骨髓源神经祖细胞及骨髓源神经元免疫细胞荧光染色

骨髓源神经祖细胞 nestin 免疫阳性产物呈绿色,DAPI复染细胞核呈蓝色。见图1D。

对照组和磁场组中骨髓源神经元细胞Tuj-1免疫阳性产物均呈绿色,DAPI复染细胞核呈蓝色。在磁场组中,Tuj-1免疫阳性反应比对照组强。见图1E,图1F。

2.3 Q-PCR结果

Q-PCR 实验结果表明:对照组和磁场组 nestin、PSA-NCAM、Ach、GABA、5-HT mRNA 表达水平与诱导前相比有显著性差异($P < 0.01$)。电磁场组 β -

III tubulin mRNA 表达水平显著高于对照组($P < 0.05$)。见表2。

图1 骨髓源神经祖细胞诱导前后形态及免疫细胞荧光染色

($\times 400$)

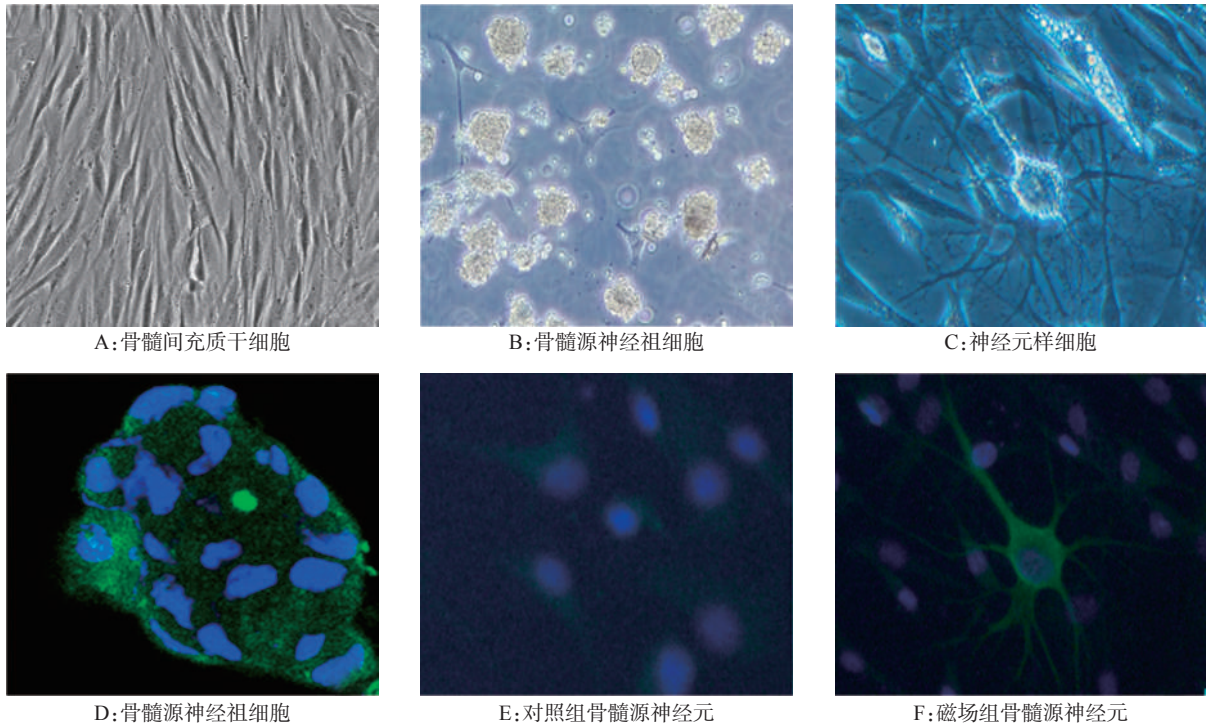


表2 各组细胞检测指标比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	神经细胞标志物 mRNA 相对量			神经递质 mRNA 相对量		
	nestin	PSA-NCAM	β -III tubulin	ACHE	5-HT	GABA
BM-NPC	1.01 \pm 0.11	1.00 \pm 0.08	1.01 \pm 0.17	1.00 \pm 0.11	1.01 \pm 0.15	1.00 \pm 0.10
对照组	0.07 \pm 0.01 ^①	0.21 \pm 0.02 ^①	0.13 \pm 0.01 ^①	0.01 \pm 0.00 ^①	0.28 \pm 0.03 ^①	0.00 \pm 0.00 ^①
磁场组	0.10 \pm 0.01 ^①	0.34 \pm 0.08 ^①	0.46 \pm 0.04 ^{①②}	0.01 \pm 0.00 ^①	0.33 \pm 0.07 ^①	0.00 \pm 0.00 ^①

与骨髓源神经祖细胞比较:① $P < 0.01$; 磁场组与对照组比较:② $P < 0.05$

3 讨论

目前神经调控技术,如光遗传学和深部脑刺激技术,在临床转化应用中引起很大关注,但其损伤性的调控方式,如需在大脑内植入光纤或者金属电极,限制其广泛应用。研究表明低频电磁场作为一种无创的临床康复治疗手段,不仅在促进干细胞增殖分化中起重要作用^[5],还可以改变离子流方向和血流变学特性,扩张血管、加速血流,促进全身血液循环和改善局部微环境^[6]。此外,电磁场可以促进神经突的发生^[7],Piacentini^[8]研究提示电磁场可以在体外促进神经祖细胞分化为神经元。另外,一些研究也证实电磁场有利于脑室区来源的神经祖细胞增殖

并诱导它们分化为神经元^[9]和通过影响神经祖细胞分化为神经元的过程进而促进大鼠海马区的神经应答^[10]。目前认为^[11-13]:低频电磁场可能通过以下途径对细胞的增殖分化起作用:①引起细胞内钙离子浓度增加,主要是因为电压门控性钙通道开放,钙离子内流;②使细胞内的cAMP表达水平升高进而诱发一系列的磷酸化生物信号放大反应;③影响细胞分子的合成;④通过生物物理效应直接促进细胞增殖和分化,使神经细胞的树突、胞体和突触结构更加成熟;⑤激活钙依赖的钾通道,逆转细胞内高钙引起的早期兴奋作用。

nestin 是一种神经上皮的特异性抗原,最初在

神经板形成时在神经细胞内表达,在神经细胞发生迁移和分化成熟后逐渐消失,故用于神经干细胞的鉴定。 β -III tubulin作为神经元细胞鉴定的特异性标志物,随神经元分化逐渐成熟, β -III tubulin的表达呈现先逐渐增加后降低,是神经元细胞的特异性微管蛋白,神经元细胞早期发育的标志; β -III tubulin还可促进微管的形成,进而影响神经元的分化及突起生长。PSA-NCAM主要在胚胎发育过程中的神经前体细胞和未成熟神经细胞表达;PSA-NCAM阳性的神经祖细胞是多能神经干细胞,能够生成各种神经细胞亚型的原始神经前体细胞。本研究表明:骨髓间充质干细胞可以在无血清的神经干细胞培养环境中通过传代形成神经球样结构,免疫细胞荧光检测结果表明:nestin呈阳性表达,并在随后的诱导分化中形成神经元样细胞。见图1D,图1E。Q-PCR结果显示:对照组和磁场组 nestin, PSA-NCAM mRNA表达水平较诱导前明显下降,且伴随 β -III tubulin mRNA表达水平上升,差异有显著性意义($P < 0.05$),见表2。研究认为:单个细胞在无血清的神经干细胞培养环境中出现聚集,相互连接呈抱团样生长形成神经球,这种神经球可能分泌多种生物活性蛋白,包括生长因子等^[14]。在这种环境下,更有利于神经细胞富集,导致神经祖细胞标志物表达升高,随着诱导进行,神经祖细胞标志物表达下降而神经细胞标志物 β -III tubulin mRNA表达水平上升,提示这种骨髓来源的细胞球具有神经祖细胞的特性,并且具有神经分化潜能。Fu等^[15]报告称:8%的骨髓间充质干细胞在神经干细胞培养环境下能产生神经球,这些间充质来源的神经祖细胞呈现神经球样的结构,并表达神经干细胞的特异性抗体。Hermann等^[16]研究称:大于60%的骨髓间充质干细胞可以转换成单克隆的神经干细胞。上述研究均提示具有显著成球能力的细胞中可能存在一种具有多分化潜能特性的骨髓来源前体细胞。本研究结果与Hermann等人观点相似,而我们的前期研究^[4]也观察到这点。

前期研究提示:50Hz电磁场有助于骨髓源神经元样的神经细胞形成。本实验诱导的骨髓源神经元样的细胞具有类似神经元的标志特性:具有树突和轴突结构;表达神经元标志物,如Tuj-1;全细胞膜片

钳记录到-65mV的细胞膜电位^[4];5-HT、AChE神经递质在基因水平有表达,见表2。对比神经元的特性:①具有树枝状分支样结构;②表达多种神经元标志物,如Tuj-1,MAP-2,NeuN,Tau,synapsin;③具有细胞极性;④形成稳定的静息膜电位,-50—70mV;⑤产生单个动作电位,可诱发重复动作电位,全细胞膜片钳可记录到特定的细胞膜电压特性曲线;⑥表达功能性神经生长因子受体或在神经生长因子受体兴奋时可检测到细胞膜电流。具备以上特征可提示细胞已达到部分成熟神经元的标准。

总之,对照上述标准:本实验诱导的骨髓源神经元具有特定的神经元样形态特征,具有典型的树突和轴突结构;表达神经元特异性表型见图1E,表2。表现主要神经元功能特征:细胞膜电位^[4]。但该骨髓源神经元与完全成熟神经元相比仍存在一定差距,例如,尚未观察到突触前和突触后的结构及其功能表现。我们认同Yang等^[17]的观点:神经元的诱导过程与初级神经元的成熟过程相类似,随着分化的进行,诱导的细胞将逐渐获得一整套完整的神经元特性。因此,本实验方法诱导的骨髓源神经元样细胞可以定义为:部分成熟的具有功能的神经元。

几乎所有的神经递质均存在于中枢神经系统,其中乙酰胆碱, γ -氨基丁酸,5-羟色胺是具有代表性的几种神经递质,是神经细胞间信息传递的重要递质,对维持神经冲动传导和脑细胞的生理活动起重要作用;Q-PCR结果显示:骨髓源神经祖细胞表达ACHE,GABA,5-HT基因,在神经细胞诱导环境中ACHE,GABA mRNA表达水平与5-HT相比较明显下降。其原因可能:随着神经球的细胞增多和体积增大,神经球内部细胞无法获得足够的营养和生长因子,维持悬浮和抑制分化的作用减弱,可能导致部分细胞在神经球形成过程中已经呈现分化状态,Reynolds等^[18]创立的无血清悬浮神经球培养方法也认为,稳定悬浮的神经球具有良好的生物特性,是神经干细胞未分化的必要条件。在诱导环境下ACHE,GABA,5-HT mRNA表达水平较诱导前明显下降,提示表达ACHE,GABA,5-HT基因的神经祖细胞在分化过程中相对表达量呈下降趋势;而对照组和磁场组的 β -III tubulin mRNA表达水平较诱导前也明显下降,该原因可能是神经元对培养环境

要求较高,随着分化进行,诱导液中生长因子逐渐消耗,诱导微环境恶化,不适合神经元的存活,并生成其他类型细胞,如胶质细胞等。从Q-PCR检测结果可知:在诱导环境中,有更多的神经祖细胞向五羟色胺能神经元分化,说明该诱导环境更适合五羟色胺能神经元的形成。在诱导过程中,对照组和磁场组5-HT mRNA表达水平未见明显差异,但磁场组中 β -III tubulin mRNA表达水平较对照组显著增加,差异有显著性意义($P < 0.05$)。提示50Hz电磁场在促进神经元分化的作用比影响5-HT mRNA表达水平的作用更明显。而电磁场能否促进骨髓源神经祖细胞向其他类型神经递质能神经元分化及神经递质表达,需要进一步研究。

综上所述,低频电磁场可促进骨髓源神经元结构成熟,影响细胞膜动作电位和突触传递的功能。电磁场对大脑神经元的刺激是利用变化的磁场通过空间耦合进入人体内部,诱发电场,产生生物电流,刺激可兴奋细胞,引起跨膜电位的改变,促使神经元去极化产生神经冲动并传播,从而影响神经系统的功能^[19-20]。这将为电磁场与干细胞在中枢神经系统治疗的应用与转化提供有价值的试验证据。

参考文献

- [1] Kim HJ, Jung J, Park JH, et al. Extremely low-frequency electromagnetic fields induce neural differentiation in bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2013, 238(8):923—931.
- [2] Park JE, Seo YK, Yoon HH, et al. Electromagnetic fields induce neural differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells via ROS mediated EGFR activation [J]. *Neurochem Int*, 2013, 62(4):418—424.
- [3] Cho H, Seo YK, Yoon HH, et al. Neural stimulation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by extremely low frequency electromagnetic fields[J]. *Biotechnol Prog*, 2012, 28(5):1329—1335.
- [4] Bai WF, Xu WC, Feng Y, et al. Fifty-Hertz electromagnetic fields facilitate the induction of rat bone mesenchymal stromal cells to differentiate into functional neurons[J]. *Cytototherapy*, 2013, 15(8):961—970.
- [5] Zheng B, Wang C, He L, et al. Neural differentiation of mesenchymal stem cells influences chemotactic responses to HGF[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(1):149—162.
- [6] Yang Y, Li L, Wang YG, et al. Acute neuroprotective effects of extremely low-frequency electromagnetic fields after traumatic brain injury in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 516(1):15—20.
- [7] Macias MY, Battocletti JH, Sutton CH, et al. Directed and enhanced neurite growth with pulsed magnetic field stimulation[J]. *Bioelectromagnetics*, 2000, 21(4):272—286.
- [8] Piacentini R, Ripoli C, Mezzogori D, et al. Extremely low-frequency electromagnetic fields promote in vitro neurogenesis via upregulation of Ca(v)1-channel activity[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 215(1):129—139.
- [9] Arias-Carrión O, Verdugo-Diaz L, Feria-Velasco A, et al. Neurogenesis in the subventricular zone following transcranial magnetic field stimulation and nigrostriatal lesions[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 78(1):16—28.
- [10] Cuccurazzu B, Leone L, Podda MV, et al. Exposure to extremely low-frequency (50 Hz) electromagnetic fields enhances adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice [J]. *Exp Neurol*, 2010, 226(1):173—182.
- [11] Wolf-Goldberg T, Barbul A, Ben-Dov N, et al. Low electric fields induce ligand-independent activation of EGF receptor and ERK via electrochemical elevation of H(+) and ROS concentrations[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(6):1396—1408.
- [12] Wu H, Ren K, Zhao W, et al. Effect of electromagnetic fields on proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2005, 25(2):185—187.
- [13] Ayşe IG, Zafer A, Sule O, et al. Differentiation of K562 cells under ELF-EMF applied at different time courses[J]. *Electromagn Biol Med*, 2010, 29(3):122—130.
- [14] Qian X, Davis AA, Goderie SK, et al. FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells[J]. *Neuron*, 1997, 18(1):81—93.
- [15] Fu L, Zhu L, Huang Y, et al. Derivation of neural stem cells from mesenchymal stemcells: evidence for a bipotential stem cell population[J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(6):1109—1121.
- [16] Hermann A, Gastl R, Liebau S, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 19):4411—4422.
- [17] Yang N, Ng YH, Pang ZP, et al. Induced neuronal cells: how to make and define a neuron[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(6):517—525.
- [18] Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell[J]. *Dev Biol*, 1996, 175(1):1—13.
- [19] 贺威忠,周鹏,林冬冬,等.磁刺激用线圈设计[J].*生物医学工程与临床*,2010,14(1):70—73.
- [20] 乔清理,王秀宏,王明时,等.磁刺激技术及其进展[J].*中国生物医学工程杂志*,2001,(3):484—487.