

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090013

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 新式高能磁場對於骨髓幹細胞軟骨分化的影響

得獎獎項 體外生物學協會獎

就讀學校 臺北市立松山高級中學

指導教師 蔡和綦

作者姓名 王維愛、譚采芸

關鍵詞 軟骨幹細胞、高能磁刺激、再生醫學

作者簡介



大家好我們是王維愛和譚采芸，就讀松山高中二年級，是一路上互相勉勵、合作無間的實驗伙伴。很榮幸得以藉由今年的國際科展競賽向各位分享實驗過程與成果。謝謝在進行研究的路途中幫助我們的師長與學長姐，熱誠全力支持、包容且用心給予我們指導與鼓勵，讓我們可以憑藉對自然科學與研究的濃厚興趣，在實驗碰到瓶頸之時陪伴我們學習成長，解決問題，我們感激無盡！

摘要

近年來，再生醫療利用幹細胞幫助組織器官新生的方法已有長足進步，但仍然面臨許多的瓶頸。例如：幹細胞注射進入人體以後，無法繼續分化生長成所需組織。最近，高能磁場的使用也是醫學界蓬勃發展的議題，我們試圖利用高能磁場誘導幹細胞的分化，希望可以增加幹細胞分化的效能，這是一創新的嘗試。我們比較新型高能磁場(RMS)與對照組於骨髓幹細胞(BMSCs)的分化效果，發現 RMS 中叢集式刺激(iTBS)的 SOX9 和 COL10 的基因表現與免疫組織化學染色明顯優於 15Hz RMS 與對照組。最佳的刺激設計為強度 50%的 iTBS 連續施打五天。我們亦發現每回合 900 pulses 有優於每回合 600 pulses 的趨勢。此實驗證實 iTBS 能夠增加 BMSCs 在體外的軟骨分化表現，反映在基因表現層次到膠原蛋白合成的層次。未來，此方法將進一步使用於動物實驗，期望擴展到臨床上用於退化性關節炎的治療，對再生醫療發展有所幫助。

Abstract

Stem cell therapy is rapidly developing due to increasing demand for a means of regenerating damaged or aging organs. However, this technique is subject to numerous challenges such as unsuitable conditions in human joint spaces for differentiation of chondrocytes or the degradation of original chondrocytes caused by injected stem cells. Repetitive magnetic stimulation (RMS) is also gaining popularity, and we used this method to stimulate the chondrogenic differentiation of stem cells, which is a novel approach for the induction of chondrocytes. We aimed to achieve the following: (1) to elucidate the efficacy of chondrogenic differentiation for RMS in comparison with the results in the control group of bone marrow stem cells; (2) to disclose the differential effect of traditional RMS versus a novel pattern of intermittent theta burst stimulation (iTBS) in the efficacy of chondrogenesis; and (3) to identify the optimal parameter settings for RMS. Quantitative polymerase chain reaction and immunohistochemistry staining were performed to analyze the effect of magnetic stimulation. Here, we demonstrated that the optimal chondrogenic outcome was achieved in response to 50% iTBS intensity during 5 consecutive days of exposure. The iTBS group exhibited significantly superior expression of chondrogenic markers, including SOX9 and COL10, compared with the 15-Hz RMS group. In immunohistochemistry analysis, the staining intensities of Alcian blue, COL2, and COL10 were all significantly higher in the iTBS group. Superior outcomes for chondrogenic differentiation were achieved with 900 pulses per session than with 600 pulses per session. The demonstrated efficacy of our optimized iTBS regimens has clear clinical implications for the injection of chondrogenic stem cells into osteoarthritic joints in the future, facilitating further development in the area of regenerative medicine.

壹、前言

一、 研究動機

目前台灣屬於高齡化的社會，許多老年人都有關節疼痛退化的問題，也常常聽到老年人接受膝關節全置換術，將原本不堪使用的膝關節由金屬物質替換，過程需住院和復健療程，消耗不少的社會成本。目前，退化性關節炎在國人中大約 15%[1]，每年接受膝關節全置換術的人約有兩萬人[2]。因此，如果在人體老化的過程中，及早使用細胞再生技術，避免無法再生的軟骨組織因面臨磨損老化，不堪使用而需接受關節置換術。目前，再生技術包含臨床上使用的增生療法，例如施打羊膜提煉物質即為增生療法的一種。然而，幹細胞使用於膝關節炎的技術，現在仍屬實驗階段。隨著科技發展，此療法應為未來最具潛力的治療方法。

幹細胞具有自我增殖與分化的能力，目前的臨床應用包括將來自某單一組織之成體幹細胞，以直接移植的方式，輸入同一組織損傷的患者，例如將骨髓的造血幹細胞植入患者體內；也可在體外人工培養幹細胞，使其分化成特定種類的源祖細胞，並將細胞帶入受過損傷的人體內，進行器官或組織再生[3]，例如目前研究中的胚胎幹細胞、骨髓幹細胞、脂肪間葉幹細胞、胎兒組織間葉幹細胞就是屬於此種。

經查閱文獻，幹細胞的臨床運用仍有一定限制，以膝關節炎的幹細胞注射治療為例，回顧文章後發現，目前拿來進行臨床試驗的幹細胞種類有脂肪間葉幹細胞、骨髓間葉幹細胞、周邊血液幹細胞等[4] - [7]。其中，間葉幹細胞最常被拿來做膝關節注射的臨床試驗幹細胞，主要是考量的是間葉幹細胞的安全性和分化為軟骨組織的潛力[4]。數篇文章指出幹細胞的注射治療可以達到臨床的改善，包含疼痛分數和關節疼痛量表[4] - [7]。和單獨使用玻尿酸注射相比，幹細胞加入玻尿酸注射的效果在影像學上有顯著的較佳改善[8], [9]。然而回顧文獻後發現，目前幹細胞注射治療仍存在一些問題，比如說注射後膝關節的生化環境是低 pH 值且存在過多的發炎介質，這種環境會干擾幹細胞的軟骨分化，甚至會造成原本軟骨的分解 [10], [11]，使注入幹細胞無法繼續分化生長成所需組織。此外，軟骨分化後，要如何使外來的軟骨細胞和原本的軟骨細胞良好結合也是一個需要解決的問題[12]。況且每篇文章的異質性和偏差相當大，每人治療結果不一，因種種因素，此療法證據等級尚須更多實驗證實[13]。

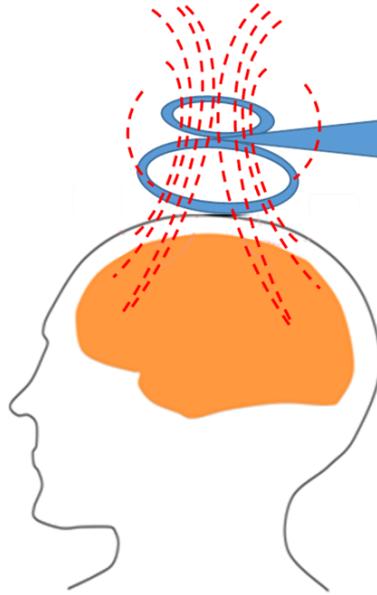
高能磁波刺激術（Repetitive magnetic stimulation, RMS）利用電流流經銅線圈，因電磁感應原理，生成一個體外大約 2T 的磁場。這個強大且快速變化的磁場無衰減地穿透過皮膚及

骨頭，直接對體內特定區域發出強力但短暫的磁性脈衝，目前較多的使用在人體腦部的神經線路上引發微量的電流，興奮了大腦皮質的神經元，並使之放電[14], [15]。經顱磁刺激的臨床應用相當多元，一篇臨床回顧文獻指出使用高頻的前額葉經顱磁刺激對於帕金森氏症相關的抑鬱症是有益處的[16]。中風後失語症的病人針對大腦的語言區使用經顱磁刺激兩個月後，證實可以改善病人的語言能力[17], [18]。經顱磁刺激除了應用於人體的神經系統試驗，也有用於幹細胞神經分化的實驗。經查閱文獻，在撰寫研究計畫時，有幾篇文章探討了 RMS 於幹細胞神經分化的影響，指出 RMS 會增強神經分化基因例如 NeuN 和 DCX 的表現 [19][20]，也可以抑制神經幹細胞往神經膠細胞的方向分化[21]。我們發現近年來有二篇體外神經幹細胞與一篇動物神經幹細胞探討高能磁場(RMS)對於幹細胞分化能力的影響。但是並無高能磁場(RMS)加上軟骨幹細胞的研究報告。

除了高能磁場(RMS)外，之前的研究有使用較小型的脈衝式磁場，其強度大約是 RMS 磁場的百分之一，顯示小型磁場也有體外增強幹細胞分化的功用。在體外以 15Hz 脈衝式磁場 (Pulse Electromagnetic Field, PEMF)刺激人類骨髓幹細胞(bone marrow stem cells ,BMSCs)，分析軟骨分相關基因，顯示基因表現有增強效果。由上述文獻得知，利用脈衝式電磁場在特定的刺激流程可以增加 BMSCs 的軟骨分化能力[22]。但是脈衝式電磁場並無法用於臨床，主要是因為磁場強度只有數個毫特斯拉(mT)，穿過皮膚後會衰減成無法檢測的磁場強度。在臨床上，必須使用的是高能磁場，才會對人體產生效果，然而我們還是會參考前人使用小型磁場的經驗，參考其參數的應用以作為實驗設計的架構還有理論根據。

RMS 除了傳統的固定頻率(1Hz, 5Hz~20Hz)之外，最近頗受矚目的新型複合波刺激(叢集式刺激, Intermittent theta burst stimulation, iTBS)，包含兩種刺激頻率，burst 頻率為 5Hz，內含三發為 50Hz 的刺激波。臨床上的研究顯示 iTBS 相較於傳統固定頻率的 RMS 來說，有較高效能產生大腦皮質的活性改變[23]。

目前於幹細胞的研究，只有一篇使用 iTBS 於神經幹細胞的實驗[19]，目前尚無使用 RMS 於軟骨幹細胞的研究報告，iTBS 於軟骨幹細胞的使用經驗亦付之闕如。因此本實驗的研究目的為探討 RMS 於體外軟骨幹細胞分化的影響能力，藉以將研究結果未來使用於人體關節的再生。



圖一、高能磁波應用於刺激治療腦部 (來源:作者)

二、 研究目的

這個實驗的目標在探討如何以適用在人體的高能磁波刺激增加幹細胞在人體外的分化作用，我們假設高能磁波刺激可以增強幹細胞的分化能力，如果我們證實這點，未來將可以應用在人體，改善幹細胞在人體的作用。我們的實驗設計是為了完成以下研究目的：

- (一) 探討高能磁波是否對 BMSCs 的軟骨分化造成影響
- (二) 探討不同刺激模式(頻率、強度)對骨髓幹細胞分化的影響
- (三) 根據實驗二最佳的刺激條件，並以此條件探討不同刺激天數的影響
- (四) 根據實驗二最佳的刺激條件，探討每回合不同施打發數對軟骨分化的影響

貳、研究方法與過程

一、 研究材料與設備

(一) 細胞來源：

實驗室提供從 4 名去連結的捐贈者骨髓血中，分離出的人類 BMSCs，編號為

AB0、AB3、AB5 和 AB8。

1. 試劑:

名稱	廠牌	名稱	廠牌
alpha-MEM	Gibico	DEPC 水	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	Corning	GENEzol™ TriRNA Pure Kit	Geneaid
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich	iScript™ cDNA Synthesis Kit	(BIO-RAD)
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco	Fast SYBR Green Master Mix	Thermo
Trypan Blue	Biological Industries	Primers	Sigma-Aldrich
DMEM-HG	Gibco	Alcian Blue	ScyTek
ITS plus Premix	BD Bioscience	Nuclear Fast Red	ScyTek
dexamethasone	Sigma-Aldrich	Super sensitive™ Polymer-HRP dection system	BioGenex
ascobate-2-phosphate	Sigma-Aldrich	Acetic Acid Solution	Sigma
TGF-β 1	(R&D Systems	Paraformaldehyde	sigma
L-prolin	Sigma-Aldrich	Histokitt	Assistent

2. 耗材：

名稱	廠牌	名稱	廠牌
10-cm 培養皿	Corning	0 ml 拋棄式吸量管 pipet	Corning
6 孔培養盤	Corning	研磨棒	
巴士德滴管	Chase Scientific	拋棄式微量吸量管 tip	
15 ml 離心管	Corning	Micro slides galss	DAKO
1.5 ml 微量離心管	Corning		

3. 設備：

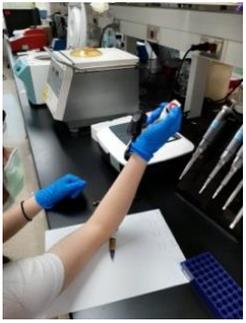
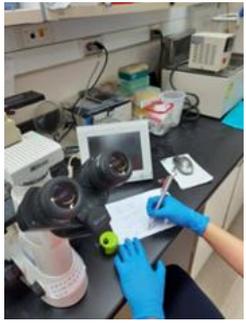
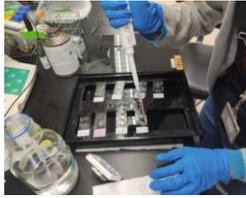
名稱	廠牌
高能磁波刺激儀 RMS	Magstim Rapid2

細胞操作檯	Thermo
細胞培養箱	Thermo
恆溫水浴槽	TKS
倒立式顯微鏡	Nicon
Pipette-aid	Drummond
微量分注器	Thermo
血球計數器	Marienfeld
桌上型離心機	Eppendorf
Nano Drop (ND-1000)	
多槽溫控式聚合酶連鎖反應器 Veriti	Applied Biosystems
即時聚合酶連鎖反應儀 Step One Plus	Applied Biosystems
石蠟塊包埋機	
石蠟切片機	
玻片加熱板	

4. 分析軟體：

名稱	版本
Prism5	Version 5.03
ipwing32	Version 4.5.0.29



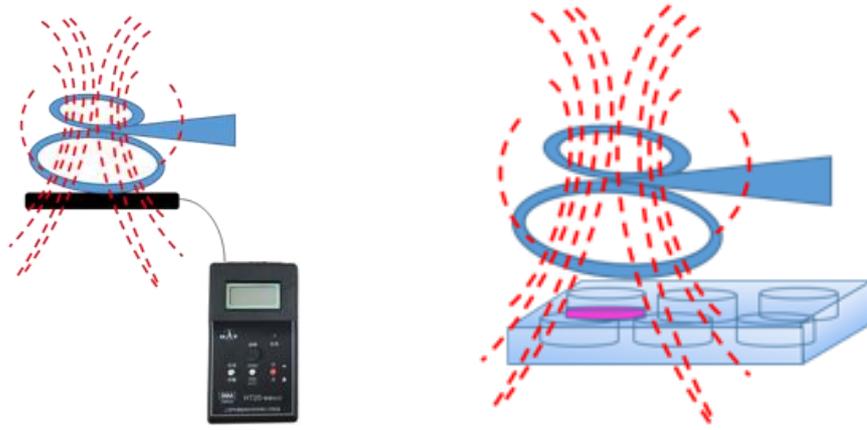
<p>(6)超高速離心機</p> 	<p>(7)細胞操作</p> 	<p>(8)分光光度計</p> 	<p>(5)顯微鏡</p> 
<p>(5)高能磁場刺激儀 (RMS)</p> 	<p>(10)高能磁場作用於細胞盤 (MAGSTIM,RAPID²)</p> 	<p>(9)轉 cDNA</p> 	<p>(10) IHC</p> 

圖二、實驗過程與器材 (來源:作者)

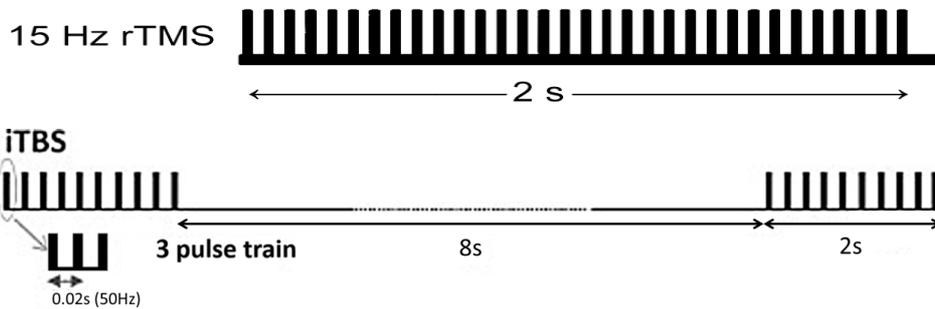
二、 研究方法

(一) 實驗一: 探討不同頻率之 RMS 在線圈下不同距離的強度檢測

因磁場強度與距離平方成反比，為了精確測量培養皿附近的磁場強度，我們用高斯計測量線圈下 1 公分到 3 公分的距離在不同頻率、不同機器輸出強度下的磁場強度。因為過去文獻常用的 PEMF 頻率是 15Hz，因此在此實驗步驟中我們採用 15Hz 當作 PEMF 的代表，也是傳統型 RMS 的代表，而 50Hz 當作叢集式 RMS 的代表，結果最低可以測到 0.09T，隨著機器輸出強度增加，磁場強度也會增加。然而我們的實驗結果發現，測得的磁場強度和頻率無關，與機器的輸出量明顯相關。本機型最大的輸出量為 2.2T，1Hz、15Hz、50Hz，強度為 30%時，在距離線圈 2 公分處，也就是培養皿附近測得的磁場強度分別為 0.31T、0.32T、0.30T(表一)。強度為 50%時，在距離線圈 2 公分處，測得的磁場強度為 0.4T 左右。15Hz 的 RMS 和 iTBS 刺激示意圖如圖所示。



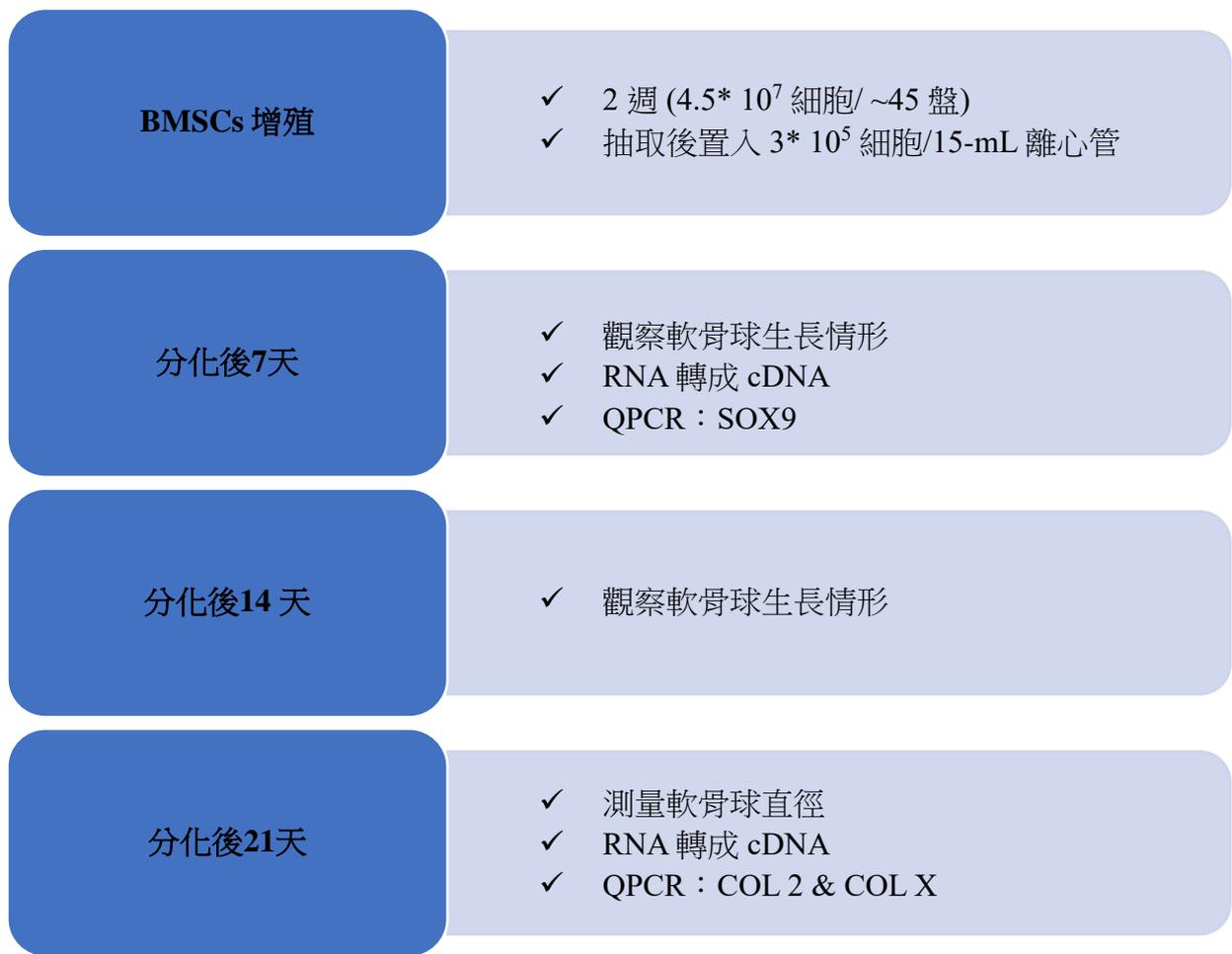
圖三、高斯計測量磁場圖 (來源:作者)



圖四、RMS 15Hz 和 iTBS 刺激示意圖 (來源:作者)

(二) 實驗二:比較不同頻率下 15Hz RMS 和新型 RMS(iTBS)刺激 BMSCs 軟骨分化

本研究藉由分析 BMSCs 進行軟骨分化後第七天的促軟骨分化因子 *SOX9* 基因表現，以及第 21 天的第二型膠原蛋白 *COL2* 與第十型膠原蛋白 *COL10* 基因與蛋白的表現，來探討 RMS(15Hz)或 iTBS 對於刺激 BMSCs 軟骨分化所造成的影響，我們首先比較兩者的差異，之後則比較不同強度(5%、30%和 50%)的刺激影響。根據過去使用 PEMF 的文獻，刺激一到三天將有不同的分化促進效果，因此實驗二採用一到三天不同累積天數的刺激時間。不同刺激頻率所使用的發數都是每天 1800 pulses，iTBS 和 15Hz 組別都以 900 pulses 施打兩回合，中間間隔兩小時。



圖五、實驗流程 (來源:作者)

1. 細胞培養：

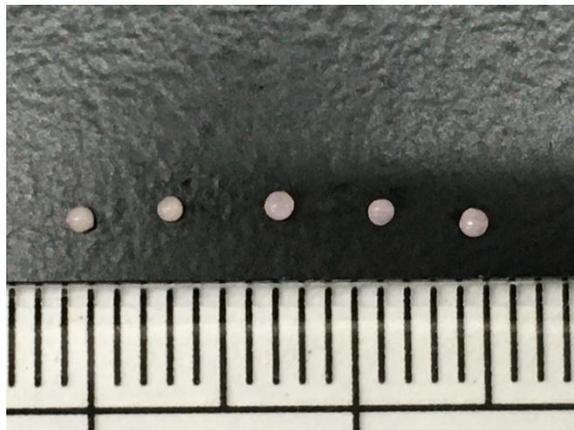
在細胞操作檯將約 3×10^5 顆 BMSCs 接種在 10-cm 培養皿中，每盤提供 10 mL 培養液 (alpha-MEM, 10% FBS)，培養在 37°C 、5% CO_2 的細胞培養箱。約 2~3 天，使用巴士德滴管移除培養液，以 PBS 清洗細胞 1 次並移除，然後更換 10 mL 培養液，直到覆滿 90% 培養皿。

2. 細胞繼代：在細胞操作檯移除培養液，使用 PBS 清洗細胞表面 2 次並移除。加入 Trypsin 作用於細胞上 37°C ，反應 5 分鐘。以 5 mL 培養液回收細胞，取 10 μL 回收的細胞液與 Trypan Blue 混勻後，取 10 μL 用血球計數器計算細胞數。以 1 : 5 的稀釋度分盤，每盤補足至 10 mL 培養液。選用 p3~p5 代數的人類 BMSCs 進行實驗。

3. 軟骨分化實驗：在細胞操作檯配製軟骨分化試劑 Chondrogenesis Induction Medium (CIM)：DMEM-HG (含有 50 ug/ml ITS plus Premix、 10^{-7} M dexamethasone、50 ug/ml

ascobate-2-phosphate、10 ng/ml TGF- β 1、40 ug/ml L-proline)。自繼代中回收的 BMSCs，以 3×10^5 顆細胞回溶在 1 mL CIM，並裝載至 15-mL 離心管。以 1,500 rpm、5 分鐘，離心讓細胞沉澱聚集成團。旋鬆管蓋讓氣體通透，培養在 37 °C、5% CO₂ 的細胞培養箱中，細胞會逐漸聚集形成球體。約 1~2 天，取出至細胞操作檯中搖晃離心管，使軟骨球懸浮。每隔 2~3 天，使用巴士德滴管移除 CIM，更換 1 mL CIM，直到第 21 天分化為成熟軟骨球。

4. 磁場刺激軟骨球：在細胞操作檯將各組軟骨球依實驗條件在吸取至 6 孔培養盤中，蓋緊上蓋。將 6 孔培養盤放到重覆性跨顱磁刺激儀的磁頭正下方，緊貼 6 孔培養盤上蓋，依照實驗條件給予不同劑量的磁刺激。完成刺激後，將 6 孔培養盤送回細胞操作檯，依照組別將美顆軟骨球分裝回各組 15-mL 離心管中，旋鬆管蓋讓氣體通透，繼續培養。
5. 直徑測量：紀錄軟骨球第 7 天、第 14 天、第 21 天的直徑，將每支離心管放置於尺規上拍照。以分析軟體量測球體相對於尺規最長與最短的直徑，取平均值。紀錄各組軟骨球直徑變化。幹細胞分化成軟骨的能力越佳，膠原蛋白表現就越多，球體會相對更較大。



圖六、軟骨球大小直徑測量 (來源:作者)

6. 萃取 RNA：使用 GENEzol™ TriRNA Pure Kit，搭配研磨棒研磨第 7 天、第 21 天的軟骨球萃取 RNA，將 RNA 回溶在 20-25 μ L DEPC 水中。接著取 1 μ L 樣本，以 Nano Drop 定量 RNA 濃度。
7. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)：各組取 1000 ng RNA，使用 iScript™ cDNA

Synthesis Kit 將 RNA 在多槽溫控式聚合酶連鎖反應器 Veriti 中轉錄成 cDNA 模板，保存於-20°C。

(1) 試劑反應量：

5x iScript Reaction Mix	4 μ L
Reverse Transcriptase	1 μ L
Nuclease-free water	Variable (15-X)
RNA template 1000 ng	Variable (X)
<hr/>	
Total volume	20 L

(2) 反應條件：

Priming	5 min at 25°C
Reverse Transcription	20 min at 46°C
RT inactivation	1 min at 95°C
<hr/>	
Optional step	Hold at 25°C

8. 即時聚合酶連鎖反應偵 Real-time polymerase chain reaction, real time-PCR (Q-PCR)：使用 Step One Plus 內建的 Fast SYBR 程式，以 cDNA 為模板，搭配對應基因的引子與 SYBR Green，執行 50 個循環的即時聚合酶連鎖反應。GAPDH 基因用作內部對照，比較各組 CT ($\Delta\Delta$ CT) 結果。

第 7 天收集的 RNA 樣本，用以分析軟骨分化的前驅基因 SOX9 的表現；第 21 天收集的 RNA 樣本，用以分析成熟軟骨球的基因 Col 2、Col X 表現。幹細胞分化成軟骨的能力越佳，基因表現量越高。引子設計參照實驗室過去發表的文獻。

(1) 引子序列：

GAPDH	Accession number : NM_017008
<hr/>	
F-primer(5' -3')	CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA
R-primer(5' -3')	GGCATGGACTGTGGTCATGA
Sox 9	Accession number : Z46629
<hr/>	
F-primer(5' -3')	CCAGGGCACCGGCCTCTACT
R-primer(5' -3')	TTCCCAGTGCTGGGGGCTGT

Collagen 2	Accession number : NM_033150
F-primer(5' -3')	TTCAGCTATGGAGATGACAATC
R-primer(5' -3')	AGAGTCCTAGAGTGACTGAG
Collagen X	Accession number : NM_000493
F-primer(5' -3')	CAAGGCACCATCTCCAGGAA
R-primer(5' -3')	AAAGGGTATTTGTGGCAGCATATT

(2) 試劑反應量：

dd H ₂ O	7 μ L
SYBR Green	10 μ L
F-primer (10 μ M)	1 μ L
R-primer (10 μ M)	1 μ L
cDNA	1 μ L
Total Volume	20 μ L

(3) 反應條件：

Holding Stage	20 sec at 95°C
Cycline Stage (50 cycles)	3 sec at 95°C
	30 sec at 60°C
Melt Curve Stage	15 sec at 90°C
	1 min at 60°C
	+0.3°C
	15 sec at 90°C

9. 石蠟包埋：第 21 天收集成熟的軟骨球，使用 PBS 中洗滌軟骨球兩。在室溫下，將軟骨球浸泡在 4% 多聚甲醛中固定 1 小時，將樣本脫水，將樣本以石蠟包埋、並切片為 4 毫米厚度保存。

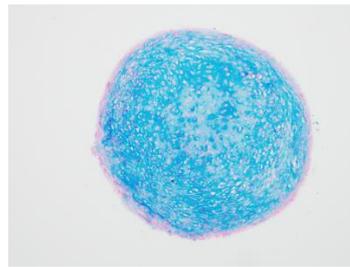
10. 化學染色(Alcian blue)：

(1) 脫蠟：將組織切片置於 65°C 加熱板上 30 分鐘，融解蠟片。再依序浸泡，

Xylene	15 分鐘
Xylene	15 分鐘

100% 酒精	5 分鐘
100% 酒精	5 分鐘
90% 酒精	5 分鐘
80% 酒精	5 分鐘
70% 酒精	5 分鐘
dd H ₂ O	5 分鐘

- (2) 染色：加上 3% Acetic acid 處理組織切片 3 分鐘後移除，加上 Alcian blue 染色 1 小時後移除，放置於流水槽，沖水褪除多餘染劑 5 分鐘後甩乾；加上 nuclear fast red 染色 1 分鐘，放置於流水槽，沖水褪除多餘染劑 5 分鐘後甩乾，拿到顯微鏡下觀察軟骨染色結果。確認顏色無誤後，使用 Histokitt 封片。
- (3) 將呈色結果使用圖像分析軟件 ipwin 32 測量整個組織切片在同一條件下染色的強度百分比。幹細胞分化成軟骨的能力越佳，呈現藍色的膠原蛋白就越深越明顯。



圖七、BMSCs 分化軟骨球切片以 Alcian blue 染色 (來源:作者)

11. 組織免疫化學染色

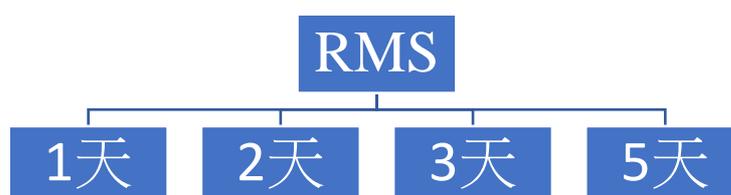
- (1) 脫蠟：(步驟同 Alcian Blue)
- (2) 染色：以 0.4 mg / ml 蛋白酶 K 處理組織切片 15 分鐘，打開抗體鍵結位置。以 3% 過氧化氫阻斷內源性過氧化物酶活性。使用 PBS 洗滌切片後，加入 1% 血清處理 5 分鐘後，再用用 PBS 洗除多餘的血清，以阻斷抗體非專一性結合。然後使用一抗 anti-human collagen 2 抗體(或 anti-human collagen X 抗體)，以 1:200 稀釋，在 4°C 冷房中與組織切片反應隔夜。隔天，使用 Polymer-HRP IHC detection system (HRP/DAB)，依照使用說明書操作，與抗體反應呈褐色。確認顏色無誤後，使用 Histokitt 封片。
- (3) 將呈色結果使用圖像分析軟件 ipwing32 測量整個組織切片在同一條件下染色的強度百分比。幹細胞分化成軟骨的能力越佳，呈現褐色的抗體反應就

越深越明顯。

12. 切片定量：選定其中一張分化最完整的影像當基準，定義該影像有效反應染色區塊的 RGB 色層數值，計算出有效反應染色區塊佔整體組織切片的比值。將該 RGB 參數套用到所有的影像中，計算出所有有效染色反應的比值，再將各組予以比較。

(三) 實驗三: 依據實驗二的結果，以最佳參數延長刺激天數之探討

由於臨床 RMS 使用於神經系統的文獻指出平均一個療程為治療十次，然而過去 PEMF 使用的刺激天數為一到三天，我們欲探討是否延長刺激的天數會增加刺激效果。因此，此延伸性實驗將依據實驗三所得到最佳參數的組別增加刺激五天的條件，以探討刺激天數對分化結果的影響。



圖八、討論 RMS 刺激天數分組圖

(四) 實驗四: 依照實驗二的結果，比較最佳參數每回合不同發數之影響

由於臨床上常使用的 RMS 設計為每回合 600 pulses，如果每回合 900 pulses 有可能會造成促進性效果變成抑制性效果。因此，此實驗步驟增加 600 pulses X3 回合的設計，但維持每天 1800 pulses 的劑量，探討每回合 600 pulses 與 900 pulses 造成的影響。

參、研究結果

一、 實驗一: 探討不同頻率之 RMS 在線圈下不同距離的強度檢測

經高斯計測量後，得到的磁場強度結果如表一。因為過去文獻常用的 PEMF 頻率是 15Hz，因此在此實驗步驟中我們採用 15Hz 當作 PEMF 的代表，而 50Hz 當作 RMS 的代表，結果顯

示最低可以測到 0.09T，隨著機器輸出強度增加，磁場強度也會增加。經由實驗結果發現，測得的磁場強度和頻率無關，與機器的輸出量明顯相關。本機型最大的輸出量為 2.2T，1Hz、15Hz、50Hz，強度為 30%時，在距離線圈 2 公分處，也就是培養皿附近測得的磁場強度分別為 0.31T、0.32T、0.30T。強度為 50%時，在距離線圈 2 公分處，測得的磁場強度為 0.4T 左右。

表一. 以高斯計測量不同距離的磁場強度

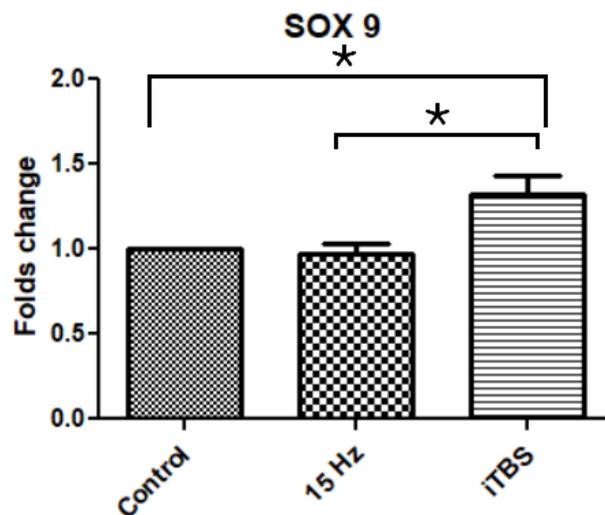
強度 Tesla		頻率		
		1Hz	15Hz	50Hz
5%	0 cm	0.2	0.16	0.19
	0.5 cm	0.13	0.12	0.11
	1 cm	0.09	0.09	0.09
10%	0 cm	0.30	0.31	0.32
	0.5 cm	0.19	0.23	0.21
	1 cm	0.15	0.19	0.13
	1.5 cm	0.09	0.15	0.11
	2 cm		0.12	0.1
30%	0 cm	0.76	0.71	0.78
	0.5 cm	0.47	0.45	0.48
	1 cm	0.40-0.41	0.40	0.45
	1.5 cm	0.34-0.35	0.35	0.35
	2 cm	0.31	0.32	0.30
	2.5 cm	0.25	0.26	0.28
	3 cm	0.21	0.23	0.27
50%	0cm	1.17	1.13	1.18
	0.5cm	0.79-0.81	0.78	0.88
	1cm	0.49-0.50	0.49	0.54
	1.5cm	0.46-0.47	0.45	0.46
	2cm	0.42	0.41	0.37
	2.5cm	0.34	0.37	0.35

	3cm	0.32	0.33	0.31
100%	0cm	2.26	2.06	
	0.5cm	1.30-1.32	1.45	
	1cm	1.12-1.14	1.12	
	1.5cm	1.03-1.04	0.99	
	2cm	0.77-0.78	0.7	
	2.5cm	0.68	0.59	
	3cm	0.55	0.52	

二、 實驗二:比較不同頻率下 15Hz RMS 和新型 RMS(iTBS)刺激 BMSCs 軟骨分化

(一) BMSCs 軟骨分化過程以 15Hz 及 iTBS 不同條件刺激後分析促軟骨分化因子 *SOX9* 基因表現狀況

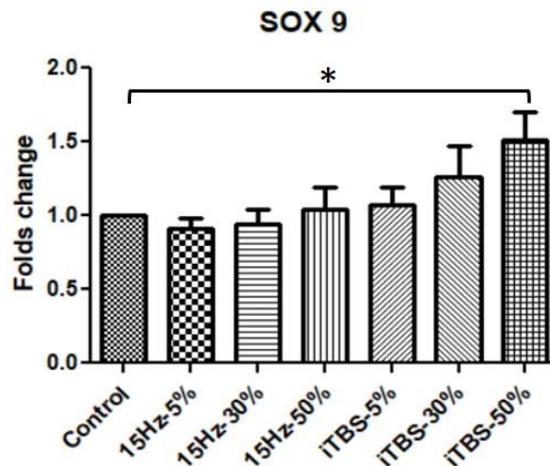
1. 經 15Hz 和 iTBS 刺激的 BMSCs 分化軟骨球與未受刺激的 control 組進行比較各組 *SOX9* 基因表現，發現以 iTBS 刺激的組別其 *SOX9* 表現量顯著大於 control 組($P < 0.0001$, 圖九)，同時也大於 15Hz 組別，兩組比較有顯著差異 ($P = 0.0291$, 圖九)。



圖九、 比較 15Hz 和 iTBS 刺激後 BMSCs 分化軟骨球的 *SOX9* 基因表現

BMSCs 進行軟骨分化實驗期間，以 15Hz 或 iTBS 進行刺激，control 組為分化期間未受任何磁刺激的組別，於分化第七天收取各組別 RNA 後以 Real time qPCR 比較促進軟骨分化因子 *SOX9* 基因表現量差異。

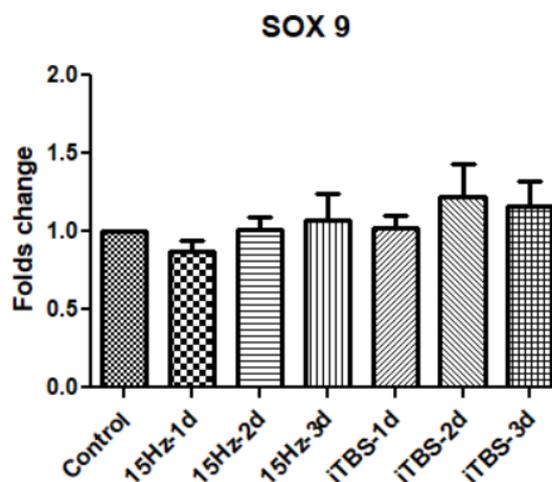
2. 以不同強度 15Hz 和 iTBS 刺激 BMSCs 進行軟骨分化，發現以 50%強度之 iTBS 刺激後，BMSCs 分化軟骨球的 *SOX9* 表現顯著優於 control 組($P < 0.05$, 圖十)，顯示 iTBS 在 50%強度對於刺激軟骨分化有較佳的效果。



圖十、比較不同強度之 15Hz 和 iTBS 刺激後 BMSCs 分化軟骨球的 *SOX9* 基因表現

BMSCs 進行軟骨分化實驗期間，以 15Hz 或 iTBS 不同強度(5%、30%及 50%)進行刺激，control 組為分化期間未受任何磁刺激的組別，於分化第七天收取各組別 RNA 後以 Real time qPCR 比較促進軟骨分化因子 *SOX9* 基因表現量差異。

3. 比較在 BMSCs 進行軟骨分化過程中以 15Hz 和 iTBS 刺激不同天數後，其 BMSCs 分化軟骨球的 *SOX9* 表現，結果顯示在各組別間 *SOX9* 表現並無顯著差異 ($P = 0.5818$, 圖十一)。

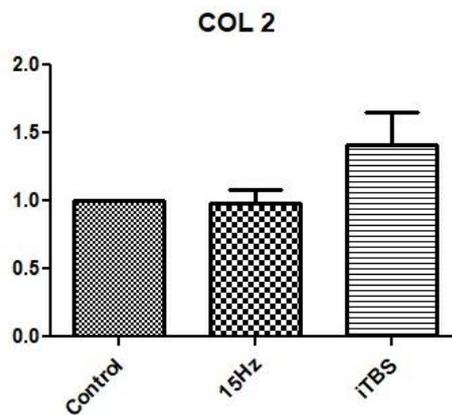


圖十一、比較 15Hz 和 iTBS 刺激 BMSCs 分化軟骨球不同天數後 *SOX9* 基因表現

BMSCs 進行軟骨分化實驗期間，以 15Hz 或 iTBS 進行刺激不同的天數，1 天(1d)、2 天(2d)或 3 天(3d)，control 組為分化期間未受任何磁刺激的組別，於分化第七天收取各組別 RNA 後以 Real time qPCR 比較促進軟骨分化因子 *SOX9* 基因表現量差異。各組別之間統計差異由單因子變異數分析(one-way ANOVA analysis)。

(二) BMSCs 軟骨分化過程以 15Hz 及 iTBS 不同條件刺激後分析第二型膠原蛋白 *COL2* 及第十型膠原蛋白 *COL10* 基因表現狀況

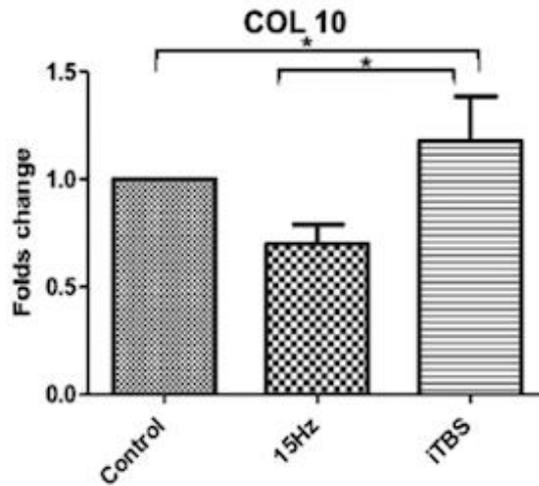
1. 經 15Hz 和 iTBS 刺激的 BMSCs 分化軟骨球與 control 組進行比較各組 *COL2* 基因表現，發現 *COL2* 表現在三組之間無顯著差異($P=0.0665$, 圖十二)。然而 iTBS 有大於 15Hz 組別的趨勢。



圖十二、比較 15Hz 和 iTBS 刺激後 BMSCs 分化軟骨球的 *COL2* 基因表現

BMSCs 進行軟骨分化實驗期間，以 15Hz 或 iTBS 進行刺激，control 組為分化期間未受任何磁刺激的組別，於分化第二十一天收取各組別軟骨球之 RNA 後以 Real time qPCR 比較第二型膠原蛋白 *COL2* 基因表現量差異。

2. 將 15Hz 和 iTBS 刺激的 BMSCs 分化軟骨球與 control 組進行比較各組 *COL10* 基因表現，結果顯示 iTBS 刺激的組別其 BMSCs 軟骨分化球的 *COL10* 表現量與 control 組有顯著差異($P=0.001$)，其表現量亦顯著高於 15Hz 刺激的組別($P=0.0392$, 圖十三)。

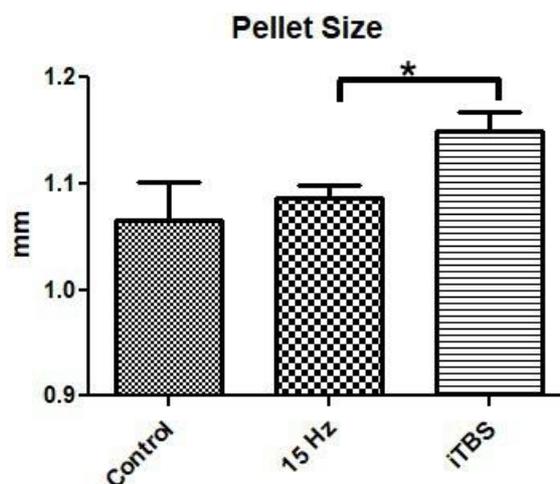


圖十三、比較 15Hz 和 iTBS 刺激後 BMSCs 分化軟骨球的 *COL10* 基因表現

BMSCs 進行軟骨分化實驗期間，以 15Hz 或 iTBS 進行刺激，control 組為分化期間未受任何磁刺激的組別，於分化第二十天收取各組別軟骨球之 RNA 後以 Real time qPCR 比較第十型膠原蛋白 *COL10* 基因表現量差異。各組別之間統計差異由單因子變異數分析(one-way ANOVA analysis)。

(三) BMSCs 軟骨分化過程以 15Hz 及 iTBS 不同條件刺激後以組織染色及組織免疫染色分析第二型膠原蛋白 *COL2* 及第十型膠原蛋白 *COL10* 蛋白表現狀況

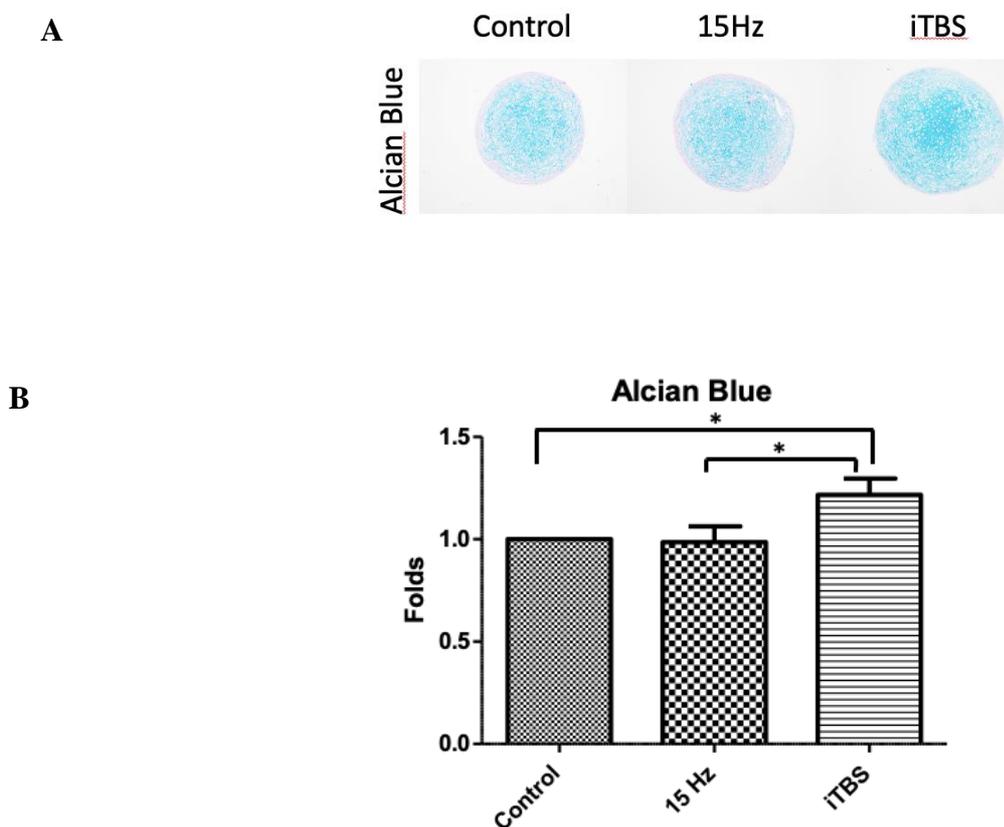
1. 測量 15Hz、iTBS 與 control 三組別的 BMSCs 軟骨分化球於分化 21 天之後形成之軟骨球體直徑，比較結果發現經 iTBS 刺激之 BMSCs 分化軟骨球大於 15Hz 組，兩者有顯著性差異($P=0.0115$ ，圖十四)。



圖十四、比較 15Hz 和 iTBS 刺激後 BMSCs 分化軟骨球的球體直徑大小

BMSCs 進行軟骨分化實驗期間，以 15Hz 或 iTBS 進行刺激，control 組為分化期間未受任何磁刺激的組別，於分化第二十天將各組別的 BMSCs 軟骨分化球進行測量直徑大小(mm: millimeter)，各組別之間統計差異由單因子變異數分析(one-way ANOVA analysis)。*表示 P 值<0.05，其兩組數據比較具有顯著差異。

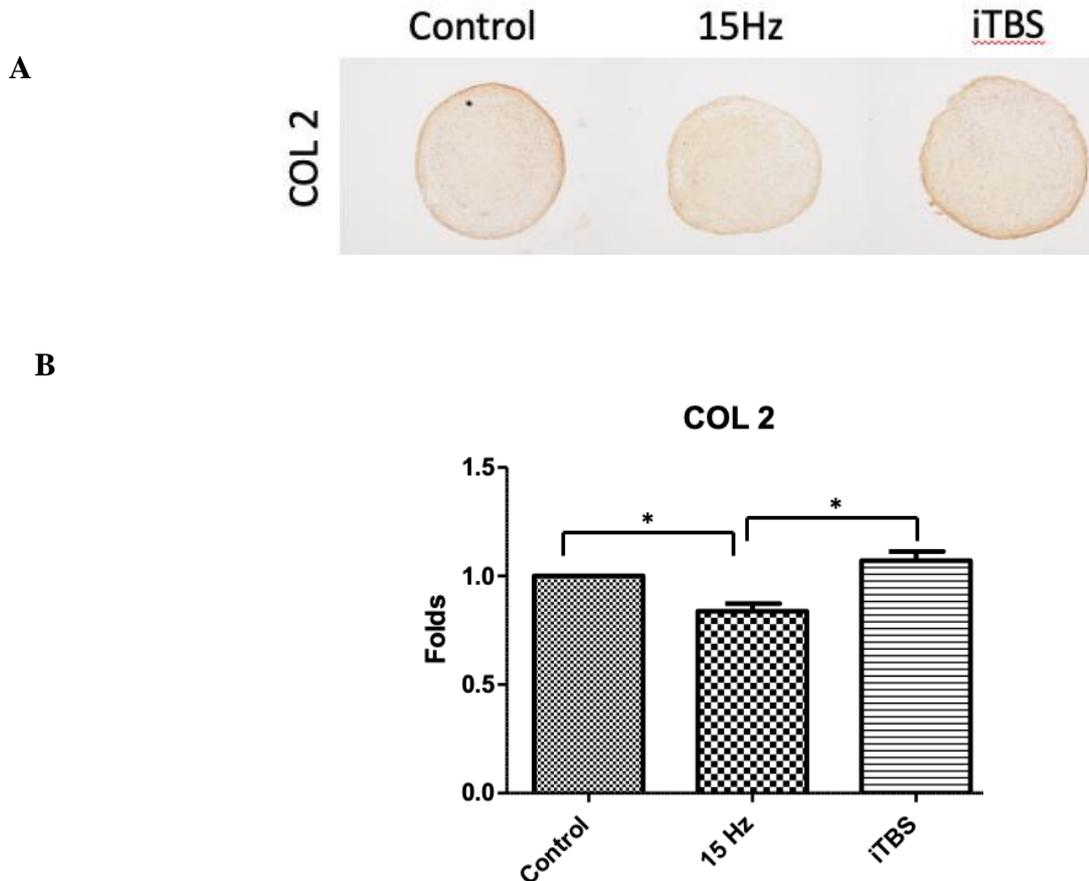
2. 以 Alcian Blue 針對 BMSCs 分化軟骨球切片上的軟骨組織蛋白黏多醣進行染色，結果可觀察到 iTBS 刺激之 BMSCs 分化軟骨球切片的染色程度與 control 組或 15Hz 組相比起來較強(圖十五 A)。以分析軟體對於染色深度進行定量，並且以背景面積進行歸一化後，以 control 組作為標準比較各組染色強度，其結果顯示 iTBS 組別的染色程度與 control 組(P=0.05)和 15Hz 組(P=0.05)相比有顯著上差異(圖十五 B)。



圖十五、比較 15Hz 和 iTBS 刺激後 BMSCs 分化軟骨球的 Alcian blue 組織染色

BMSCs 進行軟骨分化實驗期間，以 15Hz 或 iTBS 進行刺激，control 組為分化期間未受任何磁刺激的組別，於分化第二十天將各組別的 BMSCs 軟骨分化球進行切片，之後以 Alcian blue 進行染色(A)，將各組染色結果進行定量後比較其染色強度差異(B)。各組別之間統計差異由單因子變異數分析(one-way ANOVA analysis)。*表示 P 值<0.05，其兩組數據比較具有顯著差異。

3. BMSCs 分化軟骨球切片以抗體針對 COL2 進行組織免疫染色後，可觀察到 COL2 蛋白表現在經 iTBS 刺激之 BMSCs 分化軟骨球切片上染色程度較 control 組和 15Hz 強(圖十六 A)。同樣以分析軟體對於染色深度進行定量，並且以背景面積進行歸一化後，以 control 組作為標準比較各組染色強度，其結果顯示 iTBS 組別的染色程度與 15Hz 組相比有顯著上差異 (P=0.0003)(圖十六 B)。

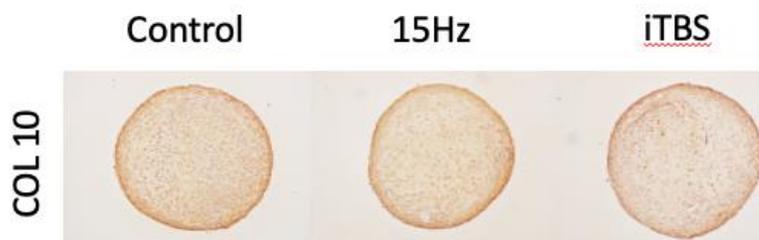


圖十六、比較 15Hz 和 iTBS 刺激後 BMSCs 分化軟骨球的 COL2 組織免疫染色

BMSCs 進行軟骨分化實驗期間，以 15Hz 或 iTBS 進行刺激，control 組為分化期間未受任何磁刺激的組別，於分化第二十天將各組別的 BMSCs 軟骨分化球進行切片，之後以針對 COL2 蛋白的抗體進行染色(A)，將各組染色結果進行定量後比較其染色強度差異(B)。各組別之間統計差異由單因子變異數分析(one-way ANOVA analysis)。*表示 P 值 <0.05，其兩組數據比較具有顯著差異。

4. BMSCs 分化軟骨球切片以抗體針對 COL10 進行組織免疫染色後，可觀察到 COL10 蛋白表現在經 iTBS 刺激之 BMSCs 分化軟骨球切片上染色程度較

control 組和 15Hz 強(圖十七)。同樣以分析軟體對於染色深度進行定量，並且以背景面積進行歸一化後，以 control 組作為標準比較各組染色強度，其結果顯示 iTBS 組別的染色程度與 15Hz 組相比有顯著上差異。

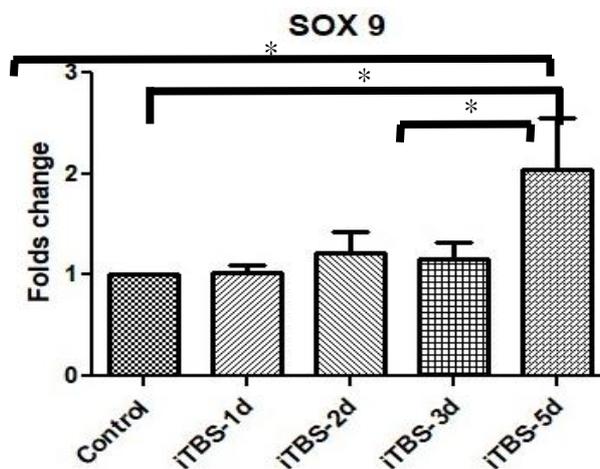


圖十七、比較 15Hz 和 iTBS 刺激後 BMSCs 分化軟骨球的 COL10 組織免疫染色

BMSCs 進行軟骨分化實驗期間，以 15Hz 或 iTBS 進行刺激，control 組為分化期間未受任何磁刺激的組別，於分化第二十天將各組別的 BMSCs 軟骨分化球進行切片，之後以針對 COL10 蛋白的抗體進行染色，將各組染色結果進行定量後比較其染色強度差異。各組別之間統計差異由單因子變異數分析(one-way ANOVA analysis)。

三、 實驗三：依據實驗二的最佳刺激條件延長天數，測試 RMS 刺激 BMSCs 進行軟骨分化的最佳天數

根據上述的結果，iTBS 組以 50%強度延長刺激天數至 5 天，於 BMSCs 軟骨分化第七天收取 RNA 分析 *SOX9* 表現量差異，發現刺激五天的組別，其 BMSCs 分化軟骨球的 *SOX9* 基因表現高於刺激三天或一天，其結果有顯著性差異($P=0.0122$,圖十八)。推測 iTBS 在 50%強度刺激五天會比刺激一天到三天更能促進 BMSCs 的軟骨分化。

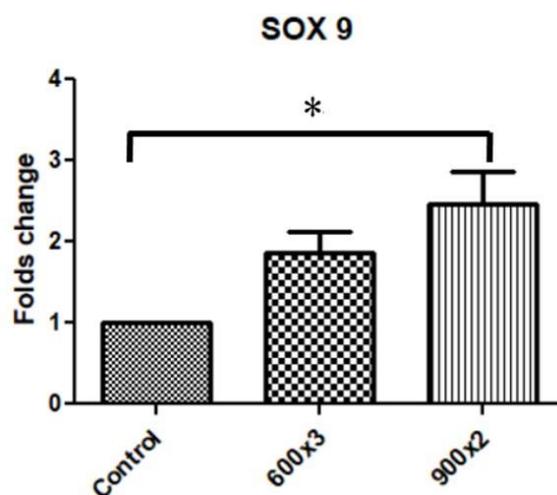


圖十八、iTBS 刺激 BMSCs 分化軟骨球不同天數後 *SOX9* 基因表現

BMSCs 進行軟骨分化實驗期間，以 50%強度之 iTBS 進行刺激不同的天數，1 天(1d)、2 天(2d)、3 天(3d) 或 5 天(5d)，control 組為分化期間未受任何磁刺激的組別，於分化第七天收取各組別 RNA 後以 Real time qPCR 比較促進軟骨分化因子 *SOX9* 基因表現量差異。各組別之間統計差異由單因子變異數分析(one-way ANOVA analysis)。*表示 P 值<0.05，其兩組數據比較具有顯著差異。

四、 實驗四: 根據實驗二的最佳參數，測試 iTBS 刺激 BMSCs 軟骨分化每回合不同發數之影響

測試 50%強度之 iTBS 刺激每日以 600 pulsesX3 回合和 900 pulsesX2 回合連續刺激 5 天對於 BMSCs 軟骨分化的影響，於 BMSCs 軟骨分化第七天收取 RNA 分析 *SOX9* 表現量差異，結果顯示以 900 pulsesX2 回合刺激與 control 組相比，*SOX9* 的表現量有顯著性差異(P=0.0233, 圖十九)，說明以 900 pulsesX2 回合比起 600 pulsesX3 回合更能促進 BMSCs 軟骨分化球之 *SOX9* 基因表現的趨勢。



圖十九、 iTBS 刺激 BMSCs 分化軟骨球每日每回合不同發數影響之 *SOX9* 基因表現

BMSCs 進行軟骨分化實驗期間，以 50%強度之 iTBS 進行 600 pulsesX3 回合(600X3)和 900 pulsesX2 回合(900X2)連續刺激 5 天，control 組為分化期間未受任何磁刺激的組別，於分化第七天收取各組別 RNA 後以 Real time qPCR 比較促進軟骨分化因子 *SOX9* 基因表現量差異。各組別之間統計差異由單因子變異數分析(one-way ANOVA analysis)。

肆、結果討論

從我們設計的實驗中，得到了三個主要的結果。過去文獻並無著墨在比較 iTBS 和傳統高能磁刺激對於 BMSCs 軟骨分化的影響，因此下列發現都是首次發表。

一、BMSCs 進行軟骨分化期間，以 iTBS 刺激之 BMSCs 軟骨分化球的 *SOX9*、*COL2* 和 *COL10* 基因，以及免疫染色平均表現都高於以 15 Hz 的傳統高能磁刺激。

二、50%強度的 iTBS 連續刺激 5 天後，BMSCs 分化軟骨球的 *SOX9* 基因表現高於連續刺激 3 天或 2 天或 1 天，而 15Hz 的傳統高能刺激並沒有天數上顯著的基因表現差異。

三、我們控制 iTBS 的模式以每回合不同刺激發數促進 BMSCs 的軟骨分化，發現 900 pulses 施打兩回合比起 600 pulses 施打三回更能促進 BMSCs 軟骨分化球之 *SOX9* 基因表現的趨勢。可見 iTBS 為頻率較高的複合波，此複合波對於幹細胞的分化可能有較好的效果，反映在基因表現層次到膠原蛋白合成的層次。

磁刺激如何影響 BMSCs 軟骨分化

多篇文章指出 PEMF 刺激會增強幹細胞的軟骨分化[22], [24], [25]，其中的機轉目前認為和鈣離子通道有關[26]。Voltage-operated calcium channels (VOCCs) 是一種表現在可興奮細胞如心肌細胞和肌肉細胞的鈣離子選擇性通道蛋白，Kawano et al. (2002)指出在成骨細胞和軟骨細胞也有相當的含量[27]。電磁刺激被證實會活化 VOCCs，從而增加鈣離子流入細胞內[28]。而鈣離子正是間葉幹細胞的軟骨分化期間所啟動的訊號傳遞路徑所需要的[29]。藉此可說明磁刺激可能藉由此機制以促進 BMSC 的軟骨分化。

iTBS 對於 BMSCs 的軟骨分化有較佳的刺激效果

SOX9 是一個從體染色體顯性遺傳疾病發現的轉錄因子。在軟骨生成時，間葉細胞會聚集並且開始分化成軟骨細胞。*SOX9* 在間葉細胞聚集的階段扮演不可或缺的角色，同時也能抑制間葉細胞往肥大的方向進行，引導間葉幹細胞朝軟骨分化[30]。因此，在幹細胞實驗中，測定 BMSCs 經誘導分化後第七天的 *SOX9* 基因表現可以視為幹細胞軟骨分化的早期指標。此外，*COL2* 和 *COL10* 是透明軟骨中已分化軟骨細胞的典型指標，其基因可以分別轉譯出第二型和第十型膠原蛋白[31]，故在第二十天測定 *COL 2* 和 *COL10* 的基因與蛋白表現量可以作為衡量軟骨分化效率的指標。Alcian Blue 屬於多價鹼性染料，它被用於染酸性多醣例如存在軟骨的醯胺聚糖，因此 Alcian Blue 的染色程度正相關於表軟骨細胞的數量[32]。*COL2* 和 *COL10* 染色的意義相同於基因表現，可作為已分化軟骨細胞的指標。

Liu 學者 (2019)討論 iTBS 在幹細胞上的應用，該文獻指出 iTBS 介入誘導性多能幹細胞的神經分化會增強神經分化基因 NeuN 的表現[19]。臨床上，文獻指出 iTBS 對於大腦的興奮效果優於傳統高頻磁波刺激[23]。Parate 學者(2017)採用 15Hz 刺激 BMSCs 來進行軟骨分化的比較，發現刺激一天以上都會促進軟骨分化基因的表現，其中只刺激一天表現最好[22]。Parate 學者 (2020)同樣選用 15Hz 刺激 BMSCs，同時縮短了每日刺激時間到三十分鐘以下，也得到了促進軟骨分化的結果[24]。上述兩篇文獻證實了 15Hz 的 PEMF 刺激軟骨分化的效果。本次實驗首次應用 iTBS 刺激 BMSCs 的軟骨分化，並選擇原本用於臨床的人體高能磁波刺激，頻率選定 15Hz，來比較何者對軟骨分化增強更顯著。在我們的研究當中，軟骨相關基因表現的測定中，經 iTBS 刺激的組別其 BMSCs 軟骨分化球 SOX9 表現量顯著大於 15Hz 的組別。暗示了 iTBS 相較 15Hz 更能有效刺激 BMSCs 的軟骨分化。

從免疫組織化學染色的結果來看，不論是 Alcian Blue、*COL2* 或是 *COL10*，iTBS 在已分化軟骨細胞的數量顯著大於 15Hz。QPCR 和免疫組織化學染色結果的一致性，證實了 iTBS 從基因表現層次到膠原蛋白合成的層次都比 15Hz 更能有效刺激骨髓幹細胞的軟骨分化。對照之前軟骨分化的文獻，主要是以免疫組織染色圖呈現不同刺激的結果，並沒有使用電腦軟體來量化染色程度的差異[22], [24], [33]。因此，本實驗以電腦軟體 ipwin32 所得到的結果更能確認 iTBS 和 15Hz 的刺激軟骨分化能力差異。可見 iTBS 為頻率較高的複合波，此複合波對於幹細胞的分化可能有較好的效果。

磁刺激強度與天數對於 BMSCs 軟骨分化的影響

我們發現 50%強度的 iTBS 相較 30%或 5%有更佳的 *SOX9*基因表現。本實驗使用高斯儀實際上測量培養皿接收的磁場強度，發現不論刺激的頻率為何，其強度都一致。和 PEMF 相比，本實驗的磁場強度大約是 100 倍，50%的磁場強度約為 0.37T，30%和 5%分別為 0.3T 和 0.1T。實驗過程中沒有發現幹細胞的凋亡，反而隨著磁場強度上升有促進幹細胞軟骨分化的趨勢。但是，當強度設定超過 50%時就會出現線圈過熱的情形，限制了我們對於更高磁場強度的討論。就目前數據在低於 0.37T 的情況下，越高的磁場強度有越能促進軟骨分化的趨勢。同時，我們也發現 iTBS 連續刺激 5 天的 *SOX9*基因表現結果優於連續刺激 3 天或 2 天或 1 天。根據 Parate 學者 (2017) 同樣使用 BMSCs 進行軟骨分化的比較，分成刺激一天、兩天和四天的組別[22]。結果顯示刺激一天組在 *SOX9*和 Aggrecan 的表現上都是最好的，但是刺激一天和兩天對於 *COL2*的表現不相上下。其整體趨勢是刺激天數越少，軟骨分化的表現會越好。而本實驗的結果是刺激五天對於 BMSCs 促進軟骨分化的效果最好，推測這兩種不同的儀器因為磁場強度的不同，導致有不同的結果，為合理的現象。在臨床上，高能磁刺激

(RMS)的使用也是需要大於五天以上的連續刺激方能達到顯著的效果，本實驗的 BMSC 的發現與臨床相符合，可以幫助未來臨床使用幹細胞治療療程標準化的建立。

改變 iTBS 每回合刺激發數對於 BMSCs 軟骨分化的影響

由於 RMS 在人體的表現，與幹細胞層面不同，我們試圖改變每回合刺激的發數，探討是否此因素會改變分化促進的結果。結果發現每一回合 900 pulses 的效果優於每一回合 600 pulses, 並且我們控制在每天固定 1800 pulses, 代表每天的能量是固定的。此結果顯示每一節較多的刺激可以造成較好的分化效果，表現在 *SOX9* 的顯著性增加。此結果和人體常用的模式不同，在人體神經系統每一回合 iTBS 的發數為 600 pulses，而且過多的刺激像是每一回合 900 pulses，則反而會造成神經系統被抑制的效果。此為神經系統 metaplasticity 的現象[34]，但很顯然，在 BMSC 的磁場促進分化則沒有這個狀況，而是每一回合 900 pulses 優於 600 pulses, 此發現也可作為未來幹細胞治療的參考。

伍、結論與應用

本實驗證實高能磁波刺激能夠增加 BMSCs 在體外的軟骨分化表現，而 iTBS 的增強效果又優於 15Hz。同時，我們定義了最佳的刺激模式，刺激發數，與天數。未來，我們將進一步使用動物實驗來驗證上述高能磁波刺激的效果。接著，應用於臨床試驗上，開發出能夠和幹細胞注射結合的高能磁波刺激方法。此注射方法可廣泛應用在退化性關節炎，因此範圍會擴大到人體全身的關節，包括頸椎、腰椎、肩關節、髖關節、膝關節和踝關節等常見的退化部位。此外，肌腱幹細胞的分化、硬骨分化和神經分化，也具有和磁波刺激結合的潛力。比如磁波刺激用於增強肌腱幹細胞的分化，有機會可以造福肌腱斷裂的患者; 硬骨分化則有用於骨缺損後骨頭癒合不佳患者的潛力。總結來說，本實驗提供了高能磁波刺激和再生醫學結合的未來發展空間。

陸、參考文獻

- [1] 李黛苹, 朱振綸, 侯勝茂, 陳政光, 葉奎麟, 釋高上, 洪立維許皓為, “退化性關節炎治療演進:自體脂肪間質幹細胞,” 台北市醫師公會會刊, 2019.
- [2] 陳佳佳, “膝關節置換好不好 健保指標告訴你”, 全民健保雙月刊, 2013.
- [3] 李茂盛, “幹細胞在臨床之應用,” in 幹細胞學, 2008, pp. 103 – 104.

- [4] J. Freitag *et al.*, “Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: Reparative pathways, safety and efficacy - A review,” *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 17, no. 1, pp. 1 – 13, 2016, doi: 10.1186/s12891-016-1085-9.
- [5] S. Lopa, A. Colombini, M. Moretti, and L. de Girolamo, “Injective mesenchymal stem cell-based treatments for knee osteoarthritis: from mechanisms of action to current clinical evidences,” *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.*, vol. 27, no. 6, pp. 2003 – 20, 2019, doi: 10.1007/s00167-018-5118-9.
- [6] H. Iijima, T. Isho, H. Kuroki, M. Takahashi, and T. Aoyama, “Effectiveness of mesenchymal stem cells for treating patients with knee osteoarthritis: a meta-analysis toward the establishment of effective regenerative rehabilitation,” *npj Regen. Med.*, vol. 3, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41536-018-0041-8.
- [7] H. I. Pas, M. Winters, H. J. Haisma, M. J. J. Koenis, J. L. Tol, and M. H. Moen, “Stem cell injections in knee osteoarthritis : a systematic review,” pp. 1125 – 1133, 2017, doi: 10.1136/bjsports-2016-096793.
- [8] K. Y. Saw *et al.*, “Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood stem cells versus hyaluronic acid: A randomized controlled trial,” *Arthrosc. - J. Arthrosc. Relat. Surg.*, vol. 29, no. 4, pp. 684 – 694, 2013, doi: 10.1016/j.arthro.2012.12.008.
- [9] K. L. Wong, K. B. L. Lee, B. C. Tai, P. Law, E. H. Lee, and J. H. P. Hui, “Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: A prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years’ follow-up,” *Arthrosc. - J. Arthrosc. Relat. Surg.*, vol. 29, no. 12, pp. 2020 – 2028, 2013, doi: 10.1016/j.arthro.2013.09.074.
- [10] J. S. Hyun *et al.*, “Enhancing stem cell survival in vivo for tissue repair.,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 5, pp. 736 – 743, 2013, doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.11.003.
- [11] G. T. H. Heldens *et al.*, “Catabolic factors and osteoarthritis-conditioned medium inhibit chondrogenesis of human mesenchymal stem cells,” *Tissue Eng. - Part A*, vol. 18, no. 1 – 2, pp. 45 – 54, 2012, doi: 10.1089/ten.tea.2011.0083.
- [12] J. Chen *et al.*, “Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 21, pp. 4793 – 4805, 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.041.

- [13] L. Orozco *et al.*, “Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: two-year follow-up results,” *Transplantation*, vol. 97, no. 11. United States, pp. e66-8, Jun. 2014, doi: 10.1097/TP.000000000000167.
- [14] L. Ustohal, “Introductory Chapter: Introduction to Transcranial Magnetic Stimulation in Neuropsychiatry,” 2018.
- [15] V. Walsh and A. Pascual-Leone, *Transcranial Magnetic Stimulation: A Neurochronometrics of Mind*. 2003.
- [16] R. Randver, “Repetitive transcranial magnetic stimulation of the dorsolateral prefrontal cortex to alleviate depression and cognitive impairment associated with Parkinson’ s disease: A review and clinical implications,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 393, no. April, pp. 88 – 99, 2018, doi: 10.1016/j.jns.2018.08.014.
- [17] M. A. Naeser *et al.*, “Improved picture naming in chronic aphasia after TMS to part of right Broca’ s area: An open-protocol study,” *Brain Lang.*, vol. 93, no. 1, pp. 95 – 105, 2005, doi: 10.1016/j.bandl.2004.08.004.
- [18] C. H. S. Barwood *et al.*, “Improved language performance subsequent to low-frequency rTMS in patients with chronic non-fluent aphasia post-stroke,” *Eur. J. Neurol.*, vol. 18, no. 7, pp. 935 – 943, 2011, doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03284.x.
- [19] G. Liu, “The effect of magnetic stimulation on differentiation of human induced pluripotent stem cells into neuron,” no. April 2019, 2020, doi: 10.1002/jcb.29647.
- [20] M. Cui *et al.*, “Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Promotes Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation after Intracerebral Hemorrhage in Mice*,” *Cell Transplant.*, vol. 28, no. 5, pp. 568 – 584, 2019, doi: 10.1177/0963689719834870.
- [21] K. Abbasnia, A. Ghanbari, M. Abedian, A. Ghanbari, S. Sharififar, and H. Azari, “The effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on proliferation and differentiation of neural stem cells,” *Anat. Cell Biol.*, vol. 48, no. 2, pp. 104 – 113, 2015, doi: 10.5115/acb.2015.48.2.104.
- [22] D. Parate *et al.*, “Enhancement of mesenchymal stem cell chondrogenesis with short-term low intensity pulsed electromagnetic fields,” no. July, pp. 1 – 13, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-09892-w.
- [23] Y. Z. Huang, M. J. Edwards, E. Rounis, K. P. Bhatia, and J. C. Rothwell, “Theta burst stimulation of the human motor cortex,” *Neuron*, vol. 45, no. 2, pp. 201 – 206, 2005, doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.033.

- [24] D. Parate, N. D. Kadir, C. Celik, E. H. Lee, and J. H. P. Hui, “Pulsed electromagnetic fields potentiate the paracrine function of mesenchymal stem cells for cartilage regeneration,” vol. 5, pp. 1 – 16, 2020.
- [25] C. Chen *et al.*, “Electromagnetic fields enhance chondrogenesis of human adipose-derived stem cells in a chondrogenic microenvironment in vitro,” no. 35, pp. 647 – 655, 2020, doi: 10.1152/jappphysiol.01216.2012.
- [26] I. Uzielienė, P. Bernotas, A. Mobasherī, and E. Bernotienė, “The role of physical stimuli on calcium channels in chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 10, 2018, doi: 10.3390/ijms19102998.
- [27] S. Kawano, S. Shoji, S. Ichinose, K. Yamagata, M. Tagami, and M. Hiraoka, “Characterization of Ca²⁺ signaling pathways in human mesenchymal stem cells,” *Cell Calcium*, vol. 32, no. 4, pp. 165 – 174, 2002, doi: 10.1016/S0143416002001240.
- [28] M. L. Pall, “Electromagnetic fields act via activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 17, no. 8, pp. 958 – 965, 2013, doi: 10.1111/jcmm.12088.
- [29] C. Matta and A. Mobasherī, “Regulation of chondrogenesis by protein kinase C: Emerging new roles in calcium signalling,” *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 5, pp. 979 – 1000, 2014, doi: 10.1016/j.cellsig.2014.01.011.
- [30] A. Jo *et al.*, “The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases,” *Genes Dis.*, vol. 1, no. 2, pp. 149 – 161, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.09.004>.
- [31] I. Martin, M. Jakob, D. Schäfer, W. Dick, G. Spagnoli, and M. Heberer, “Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints.,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 9, no. 2, pp. 112 – 118, Feb. 2001, doi: 10.1053/joca.2000.0366.
- [32] J. E. S. Alcian and J. E. Scott, “Alcianblue. Nowyouseeit, now you don’ t,” no. 1, pp. 2 – 9, 1996.
- [33] S. Mayer-wagner *et al.*, “Effects of Low Frequency Electromagnetic Fields on the Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells,” vol. 290, no. November 2010, pp. 283 – 290, 2011, doi: 10.1002/bem.20633.
- [34] O. L. Gamboa, A. Antal, V. Moliadze, and W. Paulus, “Simply longer is not better: reversal of theta burst after-effect with prolonged stimulation.,” *Exp. brain Res.*, vol. 204, no. 2, pp. 181 – 187, Jul. 2010, doi: 10.1007/s00221-010-2293-4.

【評語】 090013

作者從方法學上先以高斯計檢視刺激頻率和距離的強度，將之數據化後找出最適實驗條件。接著以 qPCR 和組織染色檢視不同刺激下 BMSCs 分化軟骨球之基因表現量。最後證實 iTBS 在連續刺激五天下能夠增加最多 SOX9 於 BMSCs 上的表現。但以未來發展來說，若想應用於活體，肌肉組織等環境因素障礙仍有待克服，如能先建立體外模擬環境證實此刺激也能使 BMSC 增加分化能力會更好，相當期待未來於動物關節退化之應用。總體來說是一則相當有趣、發展性高且學生參與度高的作品。學生善用不同實驗方式、也能夠使用合宜的統計方式呈現結果、最後能夠整合資料討論，是一篇清晰明瞭的研究。作者對於 qPCR 使用的 marker genes 還有進步的空間。