

· 基础研究 ·

低频磁刺激对 PC12 细胞分化的影响

崔冬生 顾平 刘力 赵慧新 王彦永 郭记宏 王铭维

【摘要】目的 探讨磁刺激对大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株(PC12)分化及功能的影响。**方法** 应用 Magstim220 型磁刺激仪分别刺激单纯 PC12 细胞组(M 组)和 PC12 + 神经生长因子(NGF)组(MN 组),刺激强度为 0.38 T、1.14 T、1.9 T(总强度 1.9 T),频率为 1 Hz,每天于 10 s 内连续刺激 10 次,连续刺激 9 d。每隔 1 d 观察细胞增殖和突起生长的情况,于倒置显微镜下随机取 20 个视野拍照并计数,于第 3 天、第 6 天、第 9 天留取细胞培养液检测多巴胺水平。**结果** 在 1.14 T 刺激强度下细胞突起显著增加;多巴胺水平在刺激强度为 0.38 T 时达高峰。**结论** 低频磁刺激可促进 PC12 细胞的分化及多巴胺分泌;1.14 T、1.9 T 刺激强度时联合应用 NGF 可提高 PC12 细胞的分化。

【关键词】 磁刺激; 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞; 多巴胺; 细胞分化

The effect of low-frequency magnetic stimulation on PC12 cell differentiation CUI Dong-sheng*, GU Ping, LIU Li, ZHAO Hui-xin, WANG Yan-yong, GUO Ji-hong, WANG Ming-wei. * Center laboratory, the First hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China

【Abstract】Objective To study the effect of low-frequency magnetic stimulation (MS) on differentiation on PC12 cells. **Methods** The PC12 cells were divided into two groups, one was treated with magnetic stimulation only, the other were treated with magnetic stimulation plus administration of nerve growth factor(NGF). The cells were subject to 10 seconds of magnetic stimulations once daily at a frequency of 1 Hz and intensities of 0.38 T, 1.14 T and 1.9 T, respectively, for 9 days. The proliferation and neurite extension of PC12 cells was observed by inverse microscopy every other day. Dopamine (DA) level in the culture medium was detected on the 3rd, 6th and 9th days. **Results** There was significant increase in enation of PC12 cells in the 1.14 T stimulation group. MS treatment increased the extracellular DA levels, which was peaked in the 0.38 T stimulation group. **Conclusion** Low-frequency magnetic stimulation of the PC12 cells might facilitate cell differentiation and induce the release of endogenous dopamine. Magnetic stimulation of 1.14 T in combination of NGF could improve PC12 cell differentiation.

【Key words】 Magnetic stimulation; PC12 cells; Dopamine; Differentiation

65 岁以上老年人中,帕金森病(Parkinson's disease, PD)的发病率约为 2%,我国约有数百万帕金森病患者。多巴胺替代疗法的应用,减轻或缓解了帕金森病的症状,但随着用药时间的延长,药效不断下降。近年来国内外的研究证实,过量的多巴胺可加速多巴胺神经元的死亡。Pascual-Leone 等^[1]与 Siebner 等^[2]的研究发现,用不同频率、不同强度的重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)治疗 PD 患者取得了一定的临床疗效。我院神经内科采用 rTMS 治疗 PD 患者取得同样的疗效。大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株(pheochromocytoma cells, PC12)具有分泌儿茶酚胺的功能,因此被作为 PD 的细

胞模型而被广泛用于 PD 的发病机制研究^[3]。磁刺激(magnetic stimulation, MS)是一种无痛、无创、快捷的神经电生理技术,它能兴奋深部的外周神经及大脑和脊髓,并且可以通过调节其频率、强度、刺激时间来影响中枢神经系统的兴奋性,因而对累及外周及中枢神经系统的疾病具有积极的治疗作用。低频 rTMS 可有效缓解 PD 的震颤、僵直及少动等临床症状,其治疗机制可能涉及多方面,如低频 rTMS 增强皮质内抑制而延长抑制异常神经冲动发放,并可能促进多巴胺的释放^[4]。rTMS 疗法缓解 PD 患者症状的确切机制目前尚不清楚。本实验试图通过对 PC12 的研究,为 rTMS 的临床应用提供理论基础。

材料与方法

一、材料与试剂

PC12 细胞(由美国匹兹堡大学刘永键教授惠赠);DMEM 培养液(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物制品厂);马血清(美国 Gibco 公司);

基金项目:河北省科学技术研究与发展计划项目(No. 04276101D-41)

作者单位:050031 石家庄,河北医科大学第一医院中心实验室(崔冬生、顾平、刘力),神经内科(王彦永、郭记宏、王铭维)

通讯作者:王铭维

2 mM 谷氨酰胺; 100 U/ml 青霉素; 100 U/ml 卡那霉素; 神经生长因子 (nerve growth factor, NGF, 美国 Sigma 公司); 磁刺激仪 (英国 Magstim220, 线圈直径为 9 cm, 最大输出强度为 1.9 T); 多巴胺 ELISA 法检测试剂盒 (美国 Association Gene-Engineering 公司); 倒置显微镜 (日本 Nikon, ECLIPSE TE2000-U)。

二、方法

1. 细胞培养: 取对数生长期的 PC12 细胞, 以 2×10^5 个/ml 种于 35 mm² 塑料培养皿, 每个培养皿 1 ml, 培养皿事先铺入多聚赖氨酸, 置于 37℃、5% CO₂、100% 湿度培养箱中, 次日开始进行磁刺激。

2. 刺激分组: 分为单纯磁刺激组 (M 组) 和磁刺激 + NGF 组 (MN 组), 每组刺激强度分别为 0.0 T、0.38 T、1.14 T、1.9 T, 每个强度 3 个复孔, MN 组每孔加 NGF 10 ng/ml。每天固定时间刺激, 刺激的频率为 1 Hz, 每天于 10 s 内连续刺激 10 次, 连续刺激 9 d, 刺激源距离细胞 1.0 cm。各培养皿细胞每 3 d 换液 1 次, 每隔 1 d 观察细胞增殖和突起生长的情况, 于倒置显微镜下随机取 20 个不同视野拍照并计数。根据突起长度为 2 倍以上胞体直径、3 个以上突起数目、总突起数目等 3 个不同的统计标准, 对 20 个视野中该种细胞占总细胞数的百分比进行统计。

三、培养液中多巴胺水平的检测

留取培养第 3、6、9 天上清液, 用 ELISA 法检测试剂盒检测各组培养液中多巴胺 (Dopamine, DA) 水平 (按说明书操作)。

四、统计学分析

DA 实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *F* 检验将各强度下的数值分别与 0.0 T 刺激强度进行比较, 并将 MN 组与 M 组进行比较, $P < 0.05$ 为有统计学意义。突起数据分析采用 χ^2 检验, 进行不同刺激强度组间比较, M 组、MN 组组间不同刺激强度比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、磁刺激对细胞突起生长情况的影响

表 1 磁刺激第 6 天时 M 组与 MN 组细胞突出生长情况 (个, %)

组 别	刺激强度 (T)	细胞总数 (个)	有突起细胞总数	3 个以上突起细胞数	突起长度超过胞体两倍细胞数
M 组	0.0	3 149	1 336 (42.4%)	554 (17.6%)	42 (1.33%)
	0.38	2 062	1 168 (56.6%) *	512 (24.8%) *	58 (2.81%) *
	1.14	1 646	986 (59.9%) **	519 (31.5%) * [△]	73 (4.43%) * [△]
	1.9	1 577	904 (57.3%) *	504 (32.0%) *	53 (3.36%) *
MN 组	0.0	1 806	962 (53.3%)	582 (32.2%)	48 (2.66%)
	0.38	1 419	827 (58.3%) *	428 (30.1%)	47 (3.31%) *
	1.14	1 822	1 196 (65.6%) * [☆]	658 (36.1%) * [☆]	103 (5.65%) * [☆]
	1.9	1 985	951 (47.9%) *	445 (22.4%) *	73 (3.68%) *

注: 与组内 0.0 T 刺激比较, * $P < 0.01$; 与组内 0.38 T 刺激比较, # $P < 0.05$, [△] $P < 0.01$; 与组内 0.38 T、1.9 T 刺激比较, [☆] $P < 0.01$

我们在预试验中经过连续观察发现: 连续刺激 3 d 以内细胞突起的各种变化不显著 ($P > 0.05$); 在连续刺激第 9 天, 由于分化过多, 细胞间、突起间相互叠加, 尽管分化很典型, 但很难区分和计数, 无法统计; 而在连续刺激第 6 天分化较为典型, 且细胞间、突起间相互叠加较少。为了尽量避免多次移动而影响细胞的生长和分化及方便计数和观察, 故选择第 6 天的观察结果 (图 A, 图 B)。

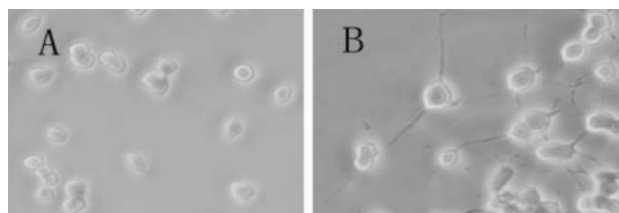


图 A M 组未施加刺激 6 d 的细胞突起

图 B M 组施加 1.14 T 刺激 6 d 的细胞突起

1. M 组: 表 1 显示, 突起的变化随磁刺激强度的增大而增加, 但在 1.9 T 刺激强度时总突起所占比例与 0.38 T 刺激类似。同时发现 3 个以上突起的细胞最多, 与 0.38 T 刺激有显著差异, 而与 1.14 T 刺激类似。突起长度的改变与 0.38 T 刺激类似, 而与 1.14 T 刺激比较差异有统计学意义。提示在 1.14 T 刺激强度下, PC12 细胞分化较为显著。

2. MN 组: 磁刺激强度改变对 PC12 细胞突起变化的影响与 M 组类似 (表 1)。

3. M 组与 MN 组突起比较: 总突起数百分率, 0.0 T 刺激强度时 MN 组显著高于 M 组 ($P < 0.01$), 0.38 T 刺激强度时 2 组间相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 强度为 1.14 T、1.9 T 时 2 组差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 3 个以上突起细胞数, 2 组在刺激强度为 0.0 T、0.38 T、1.14 T、1.9 T 时 χ^2 检验差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 突起长度超过胞体两倍细胞数, 2 组在刺激强度为 0.0 T 时 χ^2 检验差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 2 组在刺激强度为 0.38 T、1.14 T、1.9 T 时差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

二、磁刺激对 PC12 细胞分泌 DA 的影响

1. M 组:在 0.38 T 刺激强度下 DA 的水平最高,与 0.0 T 相比, $P < 0.05$;与 1.14 T、1.9 T 刺激强度相比, $P < 0.01$,随磁刺激强度增大其 DA 水平下降(表 2)。各强度第 3 天与第 6 天相比,DA 水平差异无统计学意义($P > 0.05$);但第 9 天,在 0.0 T、0.38 T 和 1.14 T 强度下与第 3 天、第 6 天相应强度相比明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 M 组不同刺激时间的培养液中
DA 水平的测定 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

刺激强度(T)	磁刺激第 3 天	磁刺激第 6 天	磁刺激第 9 天
0.0	3.81 $\pm$ 0.172	3.72 $\pm$ 0.381	3.17 $\pm$ 0.288 [△]
0.38	4.15 $\pm$ 0.292 ^{*#}	4.14 $\pm$ 0.448 ^{*#}	3.58 $\pm$ 0.410 ^{*#△}
1.14	3.41 $\pm$ 0.248	3.46 $\pm$ 0.450	2.66 $\pm$ 0.480 [△]
1.9	3.26 $\pm$ 0.179	3.29 $\pm$ 0.489	3.02 $\pm$ 0.267

注:与 0.0 T 刺激强度相比,^{*} $P < 0.05$;与 1.14 T、1.9 T 刺激强度相比,[#] $P < 0.01$;与第 3 天和第 6 天相比,[△] $P < 0.01$

2. MN 组:在 0.38 T 刺激强度下第 3、6、9 天 DA 水平均显著增高(与 0.0 T、1.14 T、1.9 T 强度相比, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);但随着刺激强度增大,DA 水平逐渐减少(1.14 T、1.9 T 与 0.38 T 相比, $P < 0.01$)。第 9 天 DA 水平与 M 组相同(表 3)。

表 3 MN 组不同刺激时间的培养上清液中
DA 水平的测定 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

刺激强度(T)	磁刺激第 3 天	磁刺激第 6 天	磁刺激第 9 天
0.0	3.41 $\pm$ 0.167	3.46 $\pm$ 0.342	3.06 $\pm$ 0.298
0.38	3.78 $\pm$ 0.257 ^{*#}	4.08 $\pm$ 0.365 ^{*△}	3.60 $\pm$ 0.439 ^{*#}
1.14	3.36 $\pm$ 0.291	2.99 $\pm$ 0.381	3.00 $\pm$ 0.290
1.9	3.25 $\pm$ 0.204	2.88 $\pm$ 0.313	3.12 $\pm$ 0.265

注:与 0.0 T 刺激强度相比,^{*} $P < 0.05$;与 1.14 T、1.9 T 刺激强度相比,[#] $P < 0.05$,[△] $P < 0.01$

3. MN 组与 M 组 DA 水平比较:MN 组第 3 天的 0.0 T、0.38 T 和第 6 天的 1.14 T、1.9 T 刺激强度下 DA 水平较 M 组明显减少($P < 0.05$),其他差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

Davis 等^[5]发现,对帕金森病患者苍白球内侧进行磁刺激时,正电子发射扫描可显示同侧运动前区皮质局部血流增加,同时患者的强直和运动迟缓症状亦得到改善,并认为 rTMS 可能激活了皮质脊髓束经内囊或经突触至纹状体通路的逆行兴奋。国内亦有人报道,磁刺激对外周神经损伤具有修复作用^[6]。

磁刺激仪所产生的感应电场在组织中将感生出许多与线圈平面平行、方向与线圈中电流方向相反的环形感应电流,由于 rTMS 诱生出的感应电流大小与组织的传导性能成正比,故传导性能良好的组织(如神经

元、轴突等)会比脂肪、皮肤等有更多的电流通过。当感应电流的强度超过神经组织兴奋的阈值时,就会引起神经细胞去极化^[7]。本实验将 PC12 细胞作为类多巴胺能神经元模型施加磁刺激,观察其突起数量和分泌 DA 水平的变化,试图揭示磁刺激治疗 PD 的机制。实验结果显示,2 组在磁刺激作用下 PC12 细胞的突起显著增多,尤其以 1.14 T 刺激强度较为显著($P < 0.01$),并连成网状,随刺激时间的延长,第 9 天其分化更为典型。磁刺激 PC12 细胞可能引起其去极化,PC12 细胞去极化后其细胞膜将出现多种变化,如膜电位变化、去磷酸化、胞内钙离子增加等,其中胞内游离钙离子是目前公认的引起细胞分化的因素之一^[8],而 Starikova 等^[8]报道,用高钾离子诱导的 PC12 细胞去极化可使其轴突增加,支持了我们用磁刺激处理 PC12 细胞可导致其分化的猜测。MN 组的对照与 M 组的对照比较,MN 组突起数量显著增多($P < 0.01$),NGF 与磁刺激共同作用时促进突起生长作用更为明显,尤其是在 1.14 T 刺激强度时($P < 0.01$),但在 1.9 T 刺激强度虽高于不刺激组,却与 0.38 T 刺激类似,说明加入 NGF 后再行磁刺激,突起数量显著增加。NGF 能促进神经细胞分化,在 PC12 细胞培养液加入一定量的 NGF 后,细胞胞体变大,细胞表面伸出突起。NGF 诱导 PC12 细胞分化的机制很多^[9],其中细胞去极化可启动 PC12 细胞分化,用高 K^+ 处理细胞去极化后,NGF 可通过 Ras/ERK 和 cAMP 信号通路刺激神经突起生长,去极化刺激通过 Ca^{2+} 和 CaM 激酶依赖信号传导途径协同作用于 NGF 诱导分化。本研究用磁刺激作用于 PC12 细胞,使其去极化,加入 NGF 后可能通过上述机制进一步促进 PC12 细胞分化。至于为何 2 组在 1.14 T 刺激强度下分化显著,目前还不清楚,可能与磁刺激产生的感应电流大小不同,所引起的去极化程度不同有关。林宏等^[10]报道, rTMS 后大鼠的苍白球的酪氨酸羟化酶阳性纤维增多,在活体上证实了磁刺激对神经元有促分化作用。

本研究发现,在 0.38 T 磁刺激条件作用下,2 组多巴胺水平显著高于其他强度($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),随着刺激强度的增大 DA 水平下降且有统计学意义。磁刺激时可在组织、细胞相应部位诱发电流,使局部去极化,而磁刺激所产生的去极化,与高 K^+ 等刺激剂一样引起细胞内钙浓度升高——即通过去极化打开膜上电压门控钙通道使外钙内流,导致囊泡库囊泡的释放,引起 DA 从 PC12 细胞分泌至细胞培养液中^[11,12]。MN 组与 M 组分别于第 3 天、第 6 天和第 9 天在各刺激强度作用下 DA 水平总体上差异无统计学意义,说明虽然 NGF 与磁刺激联合作用可使其分化增多,但对多巴胺分泌无明显促进作用。到第 9 天 DA 水平明显下降,

即随刺激时间的延长,多巴胺水平下降(此时突起数量并不减少),这可能是由于细胞内 DA 储存的量是有限的,因此其分泌量必定是有一定限度的,随着时间的延长 DA 逐渐耗竭,故 DA 的减少也是必然的。最近 Ikeda 等^[13]报道,小鼠脑经长时间(20 d) rTMS 刺激后多巴胺转运体 mRNA 表达增加,提示多巴胺转运体增加,细胞回收 DA 增加,引起细胞外 DA 减少。

综上所述,我们认为磁刺激治疗 PD 的机制可能是:磁刺激对 PD 患者中脑多巴胺能神经元具有促分化作用,同时磁刺激可促进 NGF 对神经元的分化;增加 DA 的分泌。在本研究中,我们观察到磁刺激强度以 0.38 T 和 1.14 T 为好,刺激时间为 1 周时较为适宜。

参 考 文 献

- 1 Pascual-Leone A, Valls-Sole J, Brasil-Neto JP, et al. Akinesia in Parkinson's disease. II. Effects of subthreshold repetitive transcranial motor cortex stimulation. *Neurology*, 1994, 44:892-898.
- 2 Siebner HR, Rossmeier C, Mentschel C, et al. Short-term motor improvement after subthreshold 5Hz repetitive transcranial magnetic stimulation of the primary motor hand area in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 2000, 178: 91-94.
- 3 Seth K, Agrawal AK, Aziz MH, et al. Induced expression of early response genes/oxidative injury in rat pheochromocytoma (PC12) cell line by 6-hydroxydopamine: implication for Parkinson's disease. *Neurosci*

- Let, 2002, 330: 89-93.
- 4 高峻岭, 梅元武, 张振建, 等. 低频重复经颅磁刺激在帕金森病中的康复治疗作用. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:672-674.
- 5 Davis KD, Taub E, Houle S, et al. Globus pallidus stimulation activates the cortical motor system during alleviation of parkinsonian symptoms. *Nat Med*, 1997, 3:671-674.
- 6 胡永善, 白玉龙, 林伟平, 等. 经颅磁刺激促进周围神经再生的实验研究. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:267-269.
- 7 孙永安, 赵合庆. 经颅磁刺激与脑梗死. *国外医学脑血管疾病分册*, 2002, 10:432-434.
- 8 Starikova AM, Pogorelaya NC, Kostyuk PG. Long-term depolarization changes morphological parameters of PC12 cells. *Neuroscience*, 2000, 95: 923-926.
- 9 张广献. NGF 诱导 PC12 细胞分化机制的研究进展. *国外医学分子生物学分册*, 2002, 24:165-168.
- 10 林宏, 宿长军. 经颅重复低频磁刺激后大鼠苍白球和黑质酪氨酸羟化酶阳性标记变化. *第四军医大学学报*, 2001, 22:1384-1387.
- 11 姜淑杰, 王晨光, 黄秀英, 等. 高钾离子引起 PC12 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高的机制. *第二军医大学学报*, 1998, 19:343-346.
- 12 韦顺会, 徐建华, 瞿安连, 等. 大鼠嗜铬细胞分泌的膜电容和碳纤维电极的检测. *生物物理学报*, 1999, 15:41-45.
- 13 Ikeda T, Kurosawa M, Uchikawa C, et al. Modulation of monoamine transporter expression and function by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327:218-224.

(修回日期:2005-09-27)

(本文编辑:松 明)

· 短篇论著 ·

低频电穴位刺激辅助治疗脑卒中偏瘫痉挛的疗效观察

徐勇刚 魏晖 徐福 张海峰 莫晓枫

脑卒中后偏瘫患者在恢复过程中可能出现偏瘫肢体痉挛,表现为上、下肢肌张力增高,动作缓慢,协调异常,甚至不能运动。尽早打破脑卒中偏瘫患者的痉挛模式,对其康复有着非常重要的意义。我们从 1999 至 2004 年运用低频电穴位刺激辅助治疗脑卒中偏瘫患者,结果显示低频电穴位刺激能较好地缓解脑卒中偏瘫患者痉挛状态,现报道如下。

一、资料与方法

1. 临床资料:选择我院住院的脑卒中后偏瘫患者 80 例,临床表现为半侧肢体偏瘫,且有不同程度的肌肉痉挛,头颅 CT 或 MRI 检查证实为脑梗死或脑出血。其中男 47 例,女 33 例;年龄 42~83 岁;病程 1~28 个月;脑梗死 57 例,脑出血 23 例。所有患者按住院号编序,然后根据随机数字表分为对照组和观察组,每组各 40 例,2 组性别、年龄、病程、病情比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

2. 治疗方法:对照组采用神经内科常规药物治疗,保持床上抗痉挛体位,定时翻身并被动活动患肢关节。同时采用针刺

疗法,取患侧顶颞前斜线(前神聪穴至同侧悬厘穴的连线),从上向下刺入 1.5 寸;取顶旁一线(承光穴至同侧通天穴的连线),从前向后刺入 1.5 寸。针刺方法:毫针刺入头皮后,行捻转平补平泻法,每分钟捻转 200 次,连续 1 min,留针 6 h,每日 1 次,连续治疗 15 次为 1 个疗程,共 2 个疗程,每个疗程之间休息 5 d。观察组在以上治疗的基础上行低频电穴位刺激治疗,采用日本产 SSP 低频脉冲神经治疗仪,频率为 1~10 Hz,脉宽为 50 μ s,最大功率为 40 W,耐受量。选取肩髃、手三里穴为一组,外关、合谷穴为一组,阴陵泉、三阴交为一组,用吸引泵及带有银制圆锥体电极的吸盘吸附于穴位,每次治疗 20 min,每日 1 次,连续治疗 15 次为 1 个疗程,共 2 个疗程,每个疗程之间休息 5 d。

3. 疗效评定方法:每个患者治疗前、后采用改良的 Ashworth 评分法^[1]分别对上、下肢进行评分,采用 Barthel 指数分级法进行日常生活活动(activities daily of living, ADL)能力评分,评分 >60 分,基本无功能障碍,无依赖为良;41~60 分,有功能障碍,稍依赖为中; <40 分,依赖明显或完全依赖为差。

4. 统计学分析:采用 t 检验、 χ^2 检验或 Ridit 分析进行统计