

低频脉冲电场对 PC12 细胞突起生长和 NGF 受体分布的影响

余晓君 王珺颖 张红锋* 陈树德¹

(华东师范大学生命科学学院; ¹华东师范大学物理系, 光谱与波谱学教育部重点实验室, 上海 200062)

摘要 以 PC12 细胞为实验材料, 研究低频脉冲电场($f=50$ Hz, $\tau=20$ ms, $E_{pp}=1$ V/m)对神经细胞突起生长及膜受体聚簇的影响。结果显示, 该电场能促进 NGF 受体的聚簇。电场处理 15 min 使 PC12 细胞表面的 NGF 受体发生明显的聚簇, 30 min 组次之, 5 min 组聚簇效果较弱。这表明细胞膜受体可能是电磁场与细胞相互作用的位点之一。运用细胞突起图形处理软件, 追踪测定经电场处理后 PC12 细胞的突起数量和长度, 发现该电场能显著促进细胞突起的生长, 但对突起数量没有明显的影响。

关键词 低频脉冲电场; PC12 细胞; NGF 受体; 聚集成簇; 细胞突起

低频电磁场是人类日常生活中接触最多的电磁场, 其生物学效应十分复杂。研究发现低频电磁场对生物大分子物质的合成、构象和功能等方面都有着不同程度的影响^[1], 也会改变细胞生长和分化的特性^[2]。目前认为, 低能量的低频电磁场与持久明显的生物学效应之间的一个重要的偶联位点是细胞膜受体。受体与配体的特异结合是细胞信号转导的开始, 低频电磁场干扰配体与受体的结合以及相应的信号传递途径, 最终导致相关基因表达改变或细胞代谢活动改变^[3]。

嗜铬神经瘤细胞 PC12 细胞表面具有神经生长因子(NGF)受体, NGF 是促使 PC12 细胞分化和细胞突起生长的细胞因子^[4,5]。当 PC12 细胞生长在血清培养条件下, 表现出未成熟的肾上腺嗜铬细胞的特征。而在 NGF 存在的条件下, NGF 与其受体结合后可诱导受体的聚集成簇, 并激活细胞内的信号转导途径, 使 PC12 细胞类似于交感神经细胞, 表现为细胞突起生长, 具有电兴奋性, 对外源性乙酰胆碱敏感, 钙通道数量增加和多种神经递质合成。本文采用间接免疫荧光技术, 研究经低频脉冲电场处理后, 细胞膜上 NGF 受体的分布和聚集成簇程度的变化。同时测量电场刺激后细胞突起的长度和数量的变化, 以探讨低频脉冲电场可能的作用位点。

1.1 材料

嗜铬神经瘤细胞 PC12, 购自中科院生化细胞研究所细胞库。

DMEM, 购自 Gibco 公司; 小牛血清(特级), 购自上海实生细胞生物技术有限公司; 胎牛血清, 购自黑龙江省五江制药厂; 胰蛋白酶(1:250), 购自 Difco 公司; NGF(神经生长因子), 购自 Peptotech 公司; 神经生长因子受体的抗体(NGFR 抗体, 即一抗), 购自 Chemicon 公司; 山羊抗小鼠 IgG-FITC (即二抗)和山羊血清, 购自华美生物工程公司; PI, 购自 Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯。

低频脉冲电场发生器(脉冲频率 $f=50$ Hz, 脉宽 $\tau=20$ ms, 培养液中场强峰值 $E_{pp}=1$ V/m), 由华东师大物理系生物物理教研室自制; 荧光显微镜 LEICA DC300 和 LEICA DC300 映像系统, 购自 Leica 公司; 图像处理软件, 用 VB 语言编程。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PC12 细胞接种于含 10% 胎牛血清和 5% 小牛血清的 DMEM 培养基中, 置 37 °C 5%CO₂ 培养箱进行传代培养。

1.2.2 间接免疫荧光法分析 NGF 受体聚集成簇 经

收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-02-09

国家自然科学基金重点资助项目(No.50137030)

* 通讯作者。Tel: 021-62232404, Fax: 021-62233754, E-mail:

hfzhang@bio.ecnu.edu.cn

0.25% 胰蛋白酶消化, 制成 PC12 细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^5 个/ml, 接种于预先放置盖玻片的 6 孔细胞培养板中, 2ml/孔, 37 °C 恒温培养。除阳性对照组的培养液中添加 5 ng/ml NGF 外, 其他各组的 PC12 细胞均培养在含 10% 胎牛血清和 5% 小牛血清的 DMEM 培养液中。传代培养 3 天后, 进行间接免疫荧光实验, 检测 NGF 受体的分布情况。

间接免疫荧光实验步骤为: 弃去培养液, 用 0.1 M PBS 漂洗后, 依次以 4% 多聚甲醛固定, 0.2% NP40 处理增加膜的通透性, 10% 山羊血清封阻, NGFR 的抗体处理(阴性对照组不处理), FITC 标记的二抗处理和 PI 染色, 每次处理后均用 PBS 漂洗 3~5 次, 每次 5 min。然后取出盖玻片, 以 10% 甘油封片于载玻片上, 指甲油封边, 4 °C 避光保存。荧光显微镜观察分析。

间接免疫荧光实验前进行分组和预处理: (1) 阴性对照组, 细胞不经过 NGF 受体的抗体处理, 其他步骤均与上述实验步骤相同; (2) 阳性对照组, 细胞培养液中添加终浓度为 5 ng/ml 的 NGF, 按间接免疫荧光实验步骤进行操作; (3) 正常对照组, 不经电场处理, 直接进行间接免疫荧光实验; (4) 电场实验组, 将 6 孔培养板置于平板电极间, 分别经低频脉冲电场处理 5、15 和 30 min 后再进行间接免疫荧光实验。

1.2.3 突触长度和数量的软件分析 经 0.25% 胰蛋白酶消化, 制成 PC12 细胞悬液, 调整细胞密度

为 5×10^5 个/ml, 接种于 96 孔细胞培养板培养过夜。第 2 天实验组分别用低频脉冲电场处理 5、10、15、20、30 min, 正常对照组不经电场处理, 继续培养 1 天和 2 天后, 对各组细胞进行显微摄影。将所存储的 jpg 格式文件用 VB 语言设计的细胞突起图像分析软件, 测定 PC12 细胞突起的长度和数量, 并进行数据统计和差异性分析。

2 结果

2.1 脉冲电场对 PC12 细胞膜上 NGF 受体分布的影响

图 1 是间接免疫荧光实验的显微照片, 图中黄色部分为 PI 染色的细胞核, 外围的绿色荧光结构显示细胞膜上 NGF 受体的分布位置。图 1A 表示未经 NGFR 抗体处理的阴性对照组, 图 1B 表示经 NGF 细胞因子处理的阳性对照组, 图 1C 表示未经电场处理的正常对照组, 图 1D、1E、1F 分别表示经电场处理 5、15 和 30 min 实验组。

结果表明, 低频脉冲电场刺激均能促进 PC12 细胞上 NGF 受体的聚集成簇, 其效果随作用时间而异。电场处理 5 min 的聚集成簇效果较弱; 15 min 最强, 与阳性对照组相似; 30 min 的聚集成簇效果强于 5 min 组, 但弱于 15 min 组。

2.2 低频脉冲电场对 PC12 突起生长的影响

表 1、表 2 分别表示低频脉冲电场处理后第 1 天和第 2 天细胞突起长度和数量的测量结果, 各实验

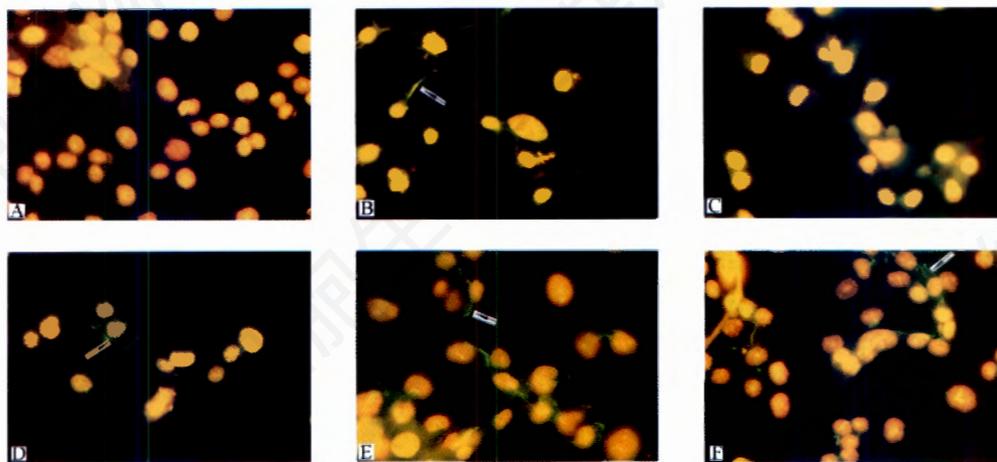


图 1 低频脉冲电场对 PC12 细胞膜上 NGF 受体分布的影响($\times 400$)

(A) 阴性对照组没有绿色荧光, 说明可以排除荧光抗体的非特异性结合; (B) NGF 阳性对照组膜上出现明显的棒状荧光斑, 且斑块的荧光强度较强(箭头所示); (C) 正常对照组绿色荧光较浅, 分布比较均匀, 无聚集成簇的现象; (D) 5 min 电场组膜上出现零星分布的荧光斑, 斑块多为点状, 荧光强度较弱(箭头所示)。说明 5 min 的电场处理可促使细胞膜上 NGF 受体轻度聚集成簇; (E) 15 min 电场组现象与阳性对照接近, 膜上的棒状及条状斑块大且长, 荧光强度也较强(箭头所示)。说明电场处理 15 min 后能显著促进膜上受体聚集成簇; (F) 30 min 电场组膜上有棒状、点状的荧光斑, 其大小和荧光强度介于 5 min 组和 15 min 组之间(箭头所示)。

表 1 低频脉冲电场处理后第 1 天细胞突起平均长度的比较($n=25$)

电场处理时间(min)	突起平均数量(条/细胞)	突起平均长度(μm)	t 检验
0	3.30	14.9 \pm 22.6	
5	3.04	15.4 \pm 14.9	0.221
10	3.21	16.6 \pm 18.3	0.593
15	3.21	21.8 \pm 20.7	1.865
20	3.28	25.0 \pm 25.4	2.121*
30	3.00	24.1 \pm 23.3	2.364*

注: 与电场处理 0 min 比较, * $P < 0.05$ 差异显著, $n =$ 细胞数。

表 2 低频脉冲电场处理后第 2 天细胞突起平均长度的比较($n=25$)

电场处理时间(min)	突起平均数量(条/细胞)	突起平均长度(μm)	t 检验
0	3.00	10.2 \pm 6.7	
5	3.00	17.3 \pm 14.9	2.366**
10	2.76	19.9 \pm 14.9	2.518**
15	2.85	29.8 \pm 16.6	5.392**
20	3.28	27.2 \pm 19.3	5.565**
30	3.30	29.0 \pm 24.0	5.090**

注: 与电场处理 0 min 比较, ** $P < 0.01$ 差异显著, $n =$ 细胞数。

组的突起长度均大于对照组。在脉冲电场处理后第 1 天, 5、10 和 15 min 组细胞突起长度的增加幅度尚不明显($P > 0.05$), 20 min 和 30 min 组细胞突起有明显的增长($P < 0.05$)。

而脉冲电场处理后的第 2 天, 各实验组细胞突起长度均极显著大于对照组($P < 0.01$), 并且电场处理 15 min 以上的效果更明显。但电场处理对细胞突起数量的影响不明显。

3 讨论

间接免疫荧光实验的结果表明, 低频脉冲电场能促使 PC12 细胞膜上的 NGF 受体发生聚集成簇, 且电场处理 15 min 的 PC12 细胞膜上荧光斑块的大小、形态和荧光强度, 与 NGF 刺激的阳性对照组细胞的斑块相似。这说明脉冲电场对细胞所产生的作用, 相似于细胞因子 NGF 的作用效果, 使 PC12 细胞膜上的 NGF 受体发生聚集成簇。细胞膜受体是细胞外激素、细胞因子等配体的作用位点, 当配体与相应的受体结合后, 通常诱导细胞膜受体形成二聚体。电磁场亦能使受体聚集成簇, 表明电磁场与细胞因子可能具有相同的作用位点, 即细胞膜受体可能是电磁场信号偶合的位点之一。孙文均等在研究 50 Hz 磁场诱导细胞膜受体簇化及电磁噪声的干预作用中也得到了相同的结果与结论(待发表), 细胞经 0.4 mT 的工频磁场处理 5 min 后, 可以明显诱导细胞上 EGF 和 TNF 受体的簇化, 然而等强度的不规则电磁噪声单独处理细胞, 却不能诱导受体的

簇化。这表明工频磁场与不规则噪声具有不同的生物信息。Drucker-Colin 等^[6]也发现低频磁场刺激与 NGF 的作用有相似性。

从脉冲电场处理后的第 1 天细胞突起长度测量结果看, 短时间电场处理不能引起细胞突起长度的明显增加, 20 min 以上的电场处理才能明显促进细胞突起的生长。而在电场处理后继续培养的第 2 天, 电场处理 5 min 到 30 min 的各实验组细胞突起长度均显著增加, 与未经电场处理的对照组有极明显差异。这表明脉冲电场有促使细胞突起生长的作用, 而且作用是稳定持久的。即使电场刺激已撤除, 2 天后仍能观察到明显的效果。Shah 等^[7]也发现用 2 Hz、0.3mT(3G) 电磁场可刺激 PC6 细胞突起增生。

结合免疫荧光实验和突起长度测量结果, 发现电场处理 15 min 和 30 min 促使细胞突起长度增加的效应, 比电场处理 5 min 强得多。同样发现, 电场处理 5 min 所诱导的 NGF 受体聚簇的程度也是较弱的。由此我们推测, 低频脉冲电场对 PC12 细胞膜上的 NGF 受体聚集成簇的影响, 可能与突起生长有关。此脉冲电场可能促进 NGF 受体聚集成簇, 并经由这个信号转导途径, 影响突起的生长。总之, 电磁场对细胞生命活动的影响是一种相当复杂的过程, 深入研究低频电磁场对神经细胞生长的影响, 有着重要的医学及实际应用意义。

参考文献 (References)

- [1] 黄卡玛等. 中国医学物理学杂志, 2000, 17: 36
[2] 张红锋等. 细胞生物学杂志, 2002, 24: 303
[3] Gold S *et al.* *Bioelectromagnetics*, 1994, 15:329
[4] 林万敏等. 复旦大学学报(自然科学版), 1998, 37: 218
[5] Luben RA *et al.* *Health-Phy*, 1991, 61:15
[6] Drucker-Colin R *et al.* *Mol Cell Neurosci*, 1994, 5: 485
[7] Shah JP *et al.* *Bioelectromagnetics*, 2001, 22: 267

The Effects of Extremely Low-frequency Pulsed Electrical Field on NGF Receptors and Outgrowth in PC12 Cells

Xiao-Jun Yu, Jun-Ying Wang, Hong-Feng Zhang*, Shu-De Chen¹

(School of Life Science, East China Normal University; ¹Key Laboratory of Ministry of Education for Optical and Magnetic Resonance Spectroscopy, Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract PC12 cells were exposed to low-frequency pulsed electrical field ($f=50$ Hz, $\tau=20$ ms, $E_{pp}=1$ V/m) to study the possible effects of electrical field exposure on nerve growth factor receptor (NGFR) and outgrowth in PC12 cells. The results showed that pulsed electrical field could obviously induce the clustering of NGFR. The clustering effect was strongest after exposure to low-frequency pulsed electrical field for 15 min, just as the effect of NGF. But it was weakest after exposure for 5 min. It suggested that receptor in the cytoplasmic membrane would be the site where low-frequency pulsed electrical field interacted with cells. By an image-analysis software, it was showed that low-frequency pulsed electrical field promoted outgrowth of PC12 cells.

Key words low-frequency pulsed electrical field; PC12 cell; NGF receptor; clustering; outgrowth

Received: November 18, 2003 Accepted: February 9, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.50137030)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62232404, Fax: 86-21-62233754, E-mail: hfzhang@bio.ecnu.edu.cn