

低频脉冲电场对 PC12 细胞酪氨酸羟化酶和多巴胺合成的影响

房元章 余晓君 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 运用 Western 印迹和 HPLC 分别测定不同时间电场刺激和刺激后不同培养时间条件下, PC12 细胞内酪氨酸羟化酶(TH)和细胞培养液中多巴胺(DA)含量的变化。结果显示, 受到短时间(5、10 min)脉冲电场刺激的 PC12 细胞, 经较短时间(2 天)的培养后, 细胞内 TH 的含量和培养液中 DA 的含量均比对照组有所提高, 但随着培养时间的延长(3~5 天), TH 和 DA 的含量均明显下降。然而, 长时间(15、20、30 min)脉冲电场刺激组则先表现为 TH 和 DA 的合成受到抑制, 但随着培养时间的延长, 其合成则被逐渐激活。采用蛋白激酶 A (PKA) 特异性抑制剂 H-89 和有丝分裂原活化蛋白激酶的激酶(MEK1/2)特异性抑制剂 U0126, 研究脉冲电场刺激所激活的与 TH 和 DA 合成相关的信号通路。结果表明, 在没有神经生长因子(NGF)存在的条件下, PC12 细胞主要通过 PKA 通路来激活 TH 的合成, 低频脉冲电场刺激也主要激活 PKA 通路, 因为抑制这条信号通路能显著抑制电场刺激所诱导的 TH 合成。

关键词 低频脉冲电场; PC12 细胞; 酪氨酸羟化酶; 多巴胺; PKA 通路; Ras/MEK 通路

流行病学研究表明, 电磁辐射能够影响大脑神经系统的结构、功能和行为, 例如焦虑、易怒、失眠等短期效应, 或是学习记忆能力下降等长期效应, 这些与多巴胺(DA)、肾上腺素(E)等儿茶酚胺类神经递质的含量变化有一定的关系^[1]。儿茶酚胺通过多巴胺能和肾上腺能受体来参与调节生物体的紧张、思维活动、情绪变化、睡眠、学习和记忆等多种生理过程。Vasquez 等^[2]发现暴露于 5.3 kv/m 的电磁场, 鼠脑中 E 在暴露 15 min 后快速上升, 但暴露 10 天后 E 水平显著降低。研究发现电磁场能降低小鼠的学习和记忆能力, 使海马神经组织结构出现损伤, 而且这些改变与电场强度有关。李平等^[3]实验结果表明, 雄性青龄大鼠在 50 Hz 磁场中暴露 10 天, 其海马组织中 E、DA 和 5-羟色胺(5-HT)含量明显升高, 经过 90 天的较高强度的磁场暴露后, E、DA 和 5-HT 含量则降低。虽然电磁场对神经化学和生理节律的影响已引起人们的广泛关注, 但是各实验室在这方面的实验数据也不尽相同甚至相互矛盾。本文以嗜铬瘤细胞系 PC12 细胞为实验材料, 研究低频脉冲电场对其 DA 合成分泌及其相关酶和细胞信号通路的影响, 从而深入探讨电磁场的生物效应及其机制。

酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是催化儿茶酚胺神经递质合成的限速酶^[4], 它催化儿茶酚胺

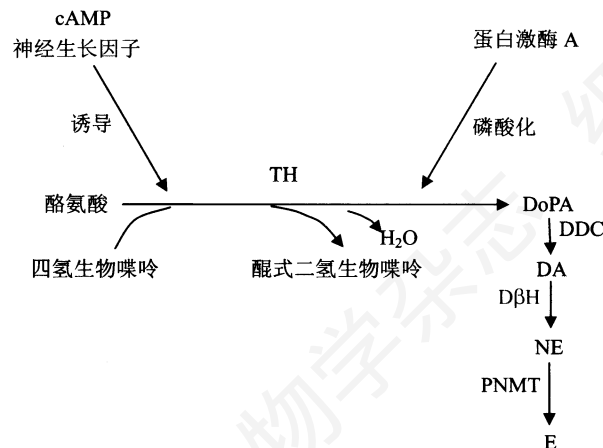


图1 儿茶酚胺合成途径

DDC: 多巴胺脱羧酶; DBH: 多巴胺 β 羟化酶; PNMT: 苯乙醇胺氮位甲基转移酶。

神经递质合成的第一步, 以酪氨酸和分子氧为底物, 以四氢生物蝶呤为辅酶, 合成左旋多巴(DOPA)、H₂O 和醌式二氢生物蝶呤。DOPA 去除一个碳酸基后成为 DA。DA 是 E 和去甲肾上腺素(NE)的前体(图 1)。研究发现, cAMP 和神经生长因子(NGF)信号通

收稿日期: 2006-04-07 接受日期: 2007-02-07

国家自然科学基金资助项目(No.50677022)

* 通讯作者。Tel: 021-62233549, Fax: 021-62233754, E-mail:

hfzhang@bio.ecnu.edu.cn

路可以诱导 TH 的转录和合成。cAMP 激活 cAMP- 依赖蛋白激酶 A(PKA), 该激酶磷酸化并激活 cAMP 反应性因子结合蛋白(CREB 和 / 或 c-jun), 它们与 TH 基因启动子区的反应因子结合后可以诱导 TH 基因转录^[5,6]。为此, 本文选择了 PKA 特异性抑制剂 H-89 和有丝分裂原活化蛋白激酶的激酶(MEK1/2)特异性抑制剂 U0126, 观察低频脉冲电场是否干扰上述信号通路, 进而影响 TH 和 DA 的合成及其生理功能。

1 材料与方法

1.1 材料

嗜铬神经瘤细胞 PC12 购自中科院生化细胞所细胞库。

DMEM 购自 Gibco 公司; 胎牛血清和小牛血清(特级)购自上海实生细胞生物技术有限公司; 胰蛋白酶(1:250)购自 Difco 公司; NGF 购自 Peprotech 公司; 鼠抗人的酪氨酸羟化酶单克隆抗体购自 Chemicon 公司; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自华美生物工程公司; PKA 特异性抑制剂 H-89 和 MEK1/2 特异性抑制剂 U0126 购自 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

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; JY92-II 超声细胞粉碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司; 电泳槽和电泳仪购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和实验处理 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。

实验时将培养瓶中的细胞接种到 6 孔板中, 接种 12 h 后换液。其中 NGF 组换液的培养基为含有 50 ng/ml NGF 的 DMEM 培养基; 对照组(不经脉冲电场刺激)和各电场刺激组换液的培养基均为 DMEM 培养基。

电场刺激组细胞培养板置于二圆形平板电极之间, 进行电场处理。分别电场刺激 5、10、15、20、30 min 后继续 37 °C 培养。在培养 0.5、1、2、3、4 天后收集细胞样品, Western 印迹测定细胞内 TH 的含量。收集第 2、3、4、5 天的细胞培养液, HPLC 测定细胞培养液中 DA 的含量。

1.2.2 HPLC 检测细胞培养液中 DA 的含量 C18 色谱柱, 流动相为缓冲液: 甲醇=95:5, 缓冲液为 0.25

mmol/L EDTA, 57.5 mmol/L NaH₂PO₄, 1.24 mmol/L 庚烷磺酸钠。流速 1.0 ml/min, 柱温保持在 35 °C, 荧光检测器波长设置为: 激发波长 280 nm, 发射波长 315 nm。样品上样量 10 μ l, 以峰面积定量。按 Folin-酚法进行样品的蛋白质定量。以 ng/mg 表示各组细胞培养液中 DA 的含量。每组作 3 个重复, 进行数据统计和差异显著性分析。

1.2.3 Western 印迹检测细胞内 TH 的含量 在 6 孔板中用 PBS 冲洗细胞 2 次。每孔加入 1 ml 胰蛋白酶消化细胞, 离心收集细胞。每管加入 200 μ l 裂解液(pH 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L PMSF, 1 mg/ml 胃蛋白酶抑制剂, 1 mg/ml 抑蛋白酶肽)。冰浴超声破碎细胞, 离心收集上清液, 按 Folin-酚法进行上清液的蛋白质定量。

取 10 μ l 上清液, 加入等体积上样缓冲液(50 mmol/L pH 6.8 Tris-HCl, 100 mmol/L DTT, 2% SDS, 0.1% 溴酚兰, 10% 甘油), 沸水浴 8 min, 上样进行 12% SDS-PAGE, 电泳条件为恒压 120 V, 400 mA, 60 min。冰浴电转 75 min。电转结束后, 取出硝酸纤维素膜(NC 膜), 用封阻液(5% 脱脂奶粉)置摇床封闭 1 h; 一抗用封阻液稀释(1:20 000), 37 °C 杂交 2 h; 磷酸缓冲液(PBS)洗膜 3 次, 每次 10 min。用 PBS 稀释酶标二抗(1:10 000), 37 °C 杂交 1 h; PBS 洗膜 5 次, 每次 10 min。将增强化学发光(ECL)显色试剂滴加在 NC 膜上, 轻摇 5 min。NC 膜用保鲜膜包好, 夹在压片夹中, 在暗房中用胶片显色, 压片曝光至产生明显条带。显影, 定影。采用 Quantity One 图像分析软件进行图像的灰度分析, 从而得出各组 PC12 细胞中 TH 的相对含量。每组作两个重复。

1.2.4 抑制剂法研究相关细胞信号通路 在接种有合适密度细胞的 6 孔板中, 分别加入含 1 μ mol/L 抑制剂(H-89 或 U0126)的 DMEM 培养基处理细胞 30 min, 然后电场刺激组用脉冲电场刺激 10 min。NGF 组培养液中添加 50 ng/ml。各组均在抑制剂存在的情况下继续培养 1 天后收集样品, 测定细胞内 TH 的含量。对照组、电场刺激 10 min 组和 NGF 组均设有一个不经抑制剂处理的空白对照。

2 结果

2.1 电场刺激对 PC12 细胞培养液中 DA 含量的影响

经脉冲电场刺激后第 2 天, NGF 组和 10 min 组培养基中 DA 含量与对照组相比均有显著升高, 分别

表1 细胞培养液中 DA 的含量($n=3$)

DA 含量 (ng/mg)	第2天	第3天	第4天	第5天
对照组	0.60±0.06	0.33±0.06	0.28±0.02	0.26±0.02
NGF 组	0.92±0.08*	0.45±0.02*	0.40±0.02*	0.74±0.10*
10 min 组	0.86±0.06*	0.19±0.07*	0.25±0.02	0.65±0.07*
20 min 组	0.45±0.03*	0.78±0.03*	0.62±0.07*	0.96±0.07*
30 min 组	0.36±0.04*	0.45±0.01*	0.62±0.07*	1.59±0.09*

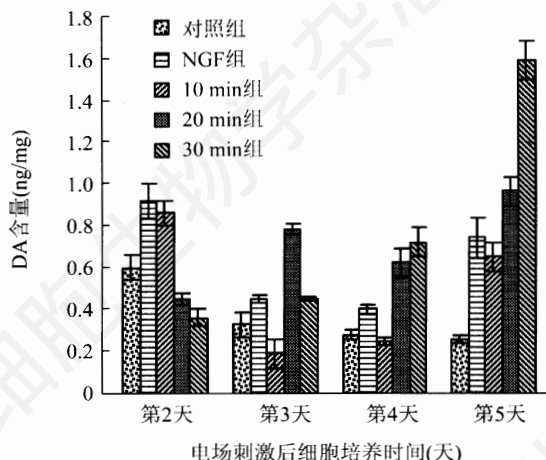
与对照组相比, * $P<0.01$ 。

图2 电场刺激后经不同培养时间的 PC12 细胞培养液中 DA 含量的变化

上升 53.3% 和 43.3% ($P<0.01$)。20 min 组和 30 min 组 DA 合成受到显著抑制, 与对照组相比下降 25.0% 和 40.0% ($P<0.01$)。随着培养时间的加长(第 3、4、5 天), 20 min 组和 30 min 组的 DA 含量逐渐上升。10 min 组在电场刺激后第 3、4 天 DA 的合成被抑制。30 min 组在电场刺激后第 5 天细胞培养液中 DA 含量达到最大值, 比对照组提高 511.5% (表 1, 图 2)。

NGF 组细胞培养液中的 DA 含量始终高于对照组, 说明 NGF 能刺激 PC12 细胞合成和分泌 DA。10 min 电场刺激后细胞迅速合成和大量分泌 DA, 但是经过短暂的高激活状态后, 其 DA 合成能力出现下降。相对而言, 20 min 和 30 min 电场刺激则先抑制 DA 的合成, 但是随着培养时间的延长, DA 含量明显上升。而且, 电场刺激时间越长, 刺激 DA 高表达的程度也越强。

2.2 电场刺激对 PC12 细胞内 TH 含量的影响

结果表明, 经不同时间(5~30 min)的脉冲电场刺激后, PC12 细胞内 TH 的含量会产生明显的差异, 且这种差异随培养时间的变化而变化。总体趋势是: 短时间电场刺激组(5 min 组和 10 min 组)的细胞能在

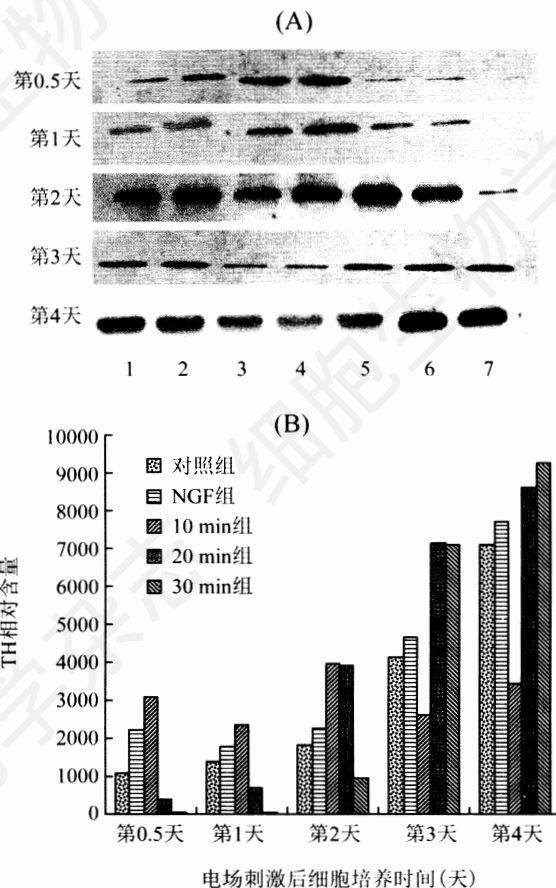


图3 电场刺激后经不同培养时间的 PC12 细胞内 TH 含量的变化

A: SDS-PAGE 结果图。1: 对照组; 2: NGF 组; 3: 5 min 组; 4: 10 min 组; 5: 15 min 组; 6: 20 min 组; 7: 30 min 组。B: 细胞内 TH 含量的变化示意图。

电场刺激后较短的培养时间内明显激活 TH 的合成, 而长时间电场刺激组(15 min 组、20 min 组和 30 min 组)的 TH 合成则受到较大程度的抑制。刺激后第 0.5 天, 10 min 组的细胞内 TH 含量与对照组相比上调了 187.8%, 而 15 min 组、20 min 组和 30 min 组分别下降了 59.0%、62.4% 和 94.7% (图 3A)。随着培养时间的延长, 短时间电场刺激组的 TH 含量逐渐减少, 即从促进合成转变为抑制合成。与此相反, 长时间电场刺激组的 TH 含量则呈现上升的趋势。刺激后第 3、4 天, 10 min 组的 TH 含量明显低于对照组, 而 20 min 组和 30 min 组的 TH 含量明显高于对照组。可见, 短时间脉冲电场刺激对 TH 合成的效应是先促进后抑制, 而长时间脉冲电场刺激对 TH 合成的效应是先抑制后促进(图 3B)。

2.3 PKA 通路和 MEK1/2 通路抑制剂处理后细胞内 TH 含量的变化

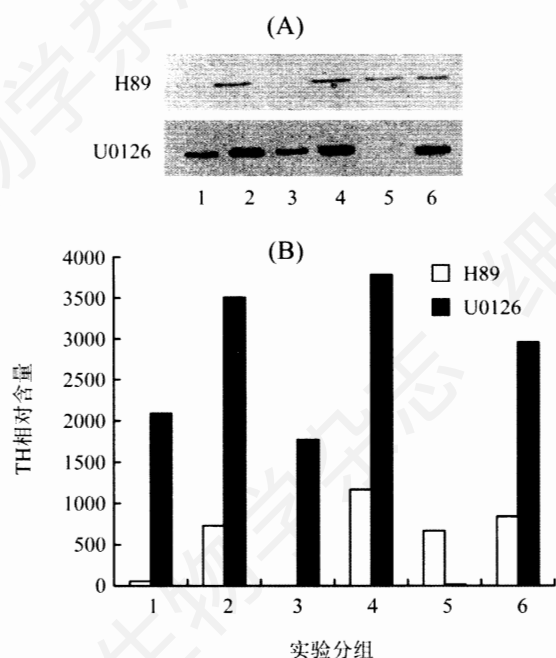


图4 经抑制剂处理后各组 TH 含量的变化

A: SDS-PAGE 结果图。B: 各组 TH 含量的变化示意图。1: 经抑制剂处理的对照组; 2: 不经任何处理的空白对照组; 3: 经抑制剂处理的 10 min 组; 4: 不经抑制剂处理的 10 min 组; 5: 经抑制剂处理的 NGF 组; 6: 不经抑制剂处理的 NGF 组。

结果显示(图4), 在对照组中加入 H89 抑制剂后 TH 含量下降了 92.9%, 10 min 组的 TH 含量则几乎完全被抑制, 而 NGF 组则只下降了 25.6%。结果表明, H89 对 10 min 组和对照组 PC12 细胞内 TH 的合成有着明显的抑制作用, 而 NGF 组的 TH 合成则没有受到很大的影响。

U0126 的作用主要集中在抑制 NGF 组的 TH 合成上, 经 U0126 处理后 NGF 组的 TH 含量下降 99.5%。对照组和 10 min 组的 TH 含量下降程度比较相近, 分别为 40.4% 和 53.2%。由此说明, 对于 NGF 刺激 TH 合成来说, Ras/MEK 是其中一条重要的细胞信号通路。

3 讨论

我们发现, 抑制 PKA 通路可以几乎完全抑制 10 min 组的 TH 合成。由此推测低频脉冲电场的作用位点主要集中在激活 PKA 通路上, 从而使 TH 的表达得以上调。实验还发现, 抑制 MEK1/2 通路能完全抑制 NGF 对细胞内 TH 合成的促进作用, 说明 MEK1/2 在 NGF 激活细胞 TH 合成中起着重要的作用。但是, U0126 可以部分抑制对照组和 10 min 组的 TH 合成,

说明 PKA 通路激活以后的下游可能对 MEK1/2 有一定的影响, 所以, 出现了抑制 PKA 通路可以完全抑制对照组和 10 min 组 TH 合成, 而抑制 MEK1/2 通路也能部分抑制对照组和 10 min 组 TH 合成的现象。总之, 脉冲电场主要通过激活 PKA 通路来调控细胞合成 TH, 进而促进 DA 的合成。

从 TH 和 DA 含量测定的两组实验结果可以看出, 经脉冲电场短时间刺激后的细胞能快速地上调 TH 的合成和 DA 的分泌, TH 含量可上调至对照组的近一倍左右。而经长时间电场刺激的细胞其 TH 和 DA 的合成则先受到明显的抑制。随着培养时间的延长, 短时间电场刺激组 TH 和 DA 的合成逐渐受到抑制, 而长时间电场刺激组则开始上调 TH 和 DA 的合成。结果说明, 短时间电场刺激对 TH 和 DA 合成的效应是先促进后抑制, 而长时间电场刺激对 TH 和 DA 合成的效应是先抑制后促进。

为什么短时间电场刺激对 TH 合成的效应是先促进后抑制, 而长时间电场刺激对 TH 合成的效应是先抑制后促进? 我们从 DA 自身受体介导的 DA 生物合成负反馈调控的机制中得到了启发。胡刚等^[7]证实, 突触前多巴胺受体(DA自身受体)通过抑制性Gi与腺苷酸环化酶(AC)的活性负偶联, 从而抑制依赖 cAMP 的 PKA 对 TH 的磷酸化激活, 反馈抑制 DA 的生物合成。由此, 我们认为脉冲电场可能改变 DA 的构象, 干扰 DA 与其受体的结合。短时间电场刺激, 有可能减弱 DA 与其受体的结合, 导致 PKA 信号通路激活 TH, 促进 DA 的生物合成。然而新合成的 DA 则能与其受体正常结合, 反馈抑制 TH 的活性。所以, 短时间电场处理对 TH 的合成是先增强后抑制的作用。而长时间电场刺激, 则增强了多巴胺与其受体的结合, 抑制 PKA 信号通路对 TH 的激活, 从而抑制 DA 的生物合成。然而随着 DA 的降解或作用消失, PKA 信号通路又反馈激活 TH 和 DA 的合成。所以, 长时间电场处理对 TH 的合成是先抑制后增强的作用。我们前期研究也发现^[8], 低频脉冲电场的作用通常具有双向性, 如短时间电场刺激能促进细胞增殖, 而长时间电场刺激则抑制细胞增殖。可见, 电磁场的生物效应是相当复杂的, 有些效应并不是即时的, 会有一个滞后的和长期的作用效果。

参考文献 (References)

- [1] Selmaoui B *et al. Life Sci*, 1996, **58**: 1539
- [2] Vasquez BJ *et al. Bioelectromagnetics*, 1988, **9**: 229

- [3] 李平等。环境与健康杂志, 2006, 23: 25
[4] Nagatsu T et al. *J Biol Chem*, 1964, 239: 2910
[5] Hu G et al. *Acta Pharmacol Sin*, 1992, 13: 104
[6] Hu G et al. *Acta Pharmacol Sin*, 1995, 16: 376
[7] 胡刚等。基础医学和临床, 1998, 118: 20
[8] 张红锋等。细胞生物学杂志, 2002, 24: 303

The Effects of Low-frequency Pulsed Electrical Field on the Synthesis of Tyrosine Hydroxylase and Dopamine in PC12 Cells

Yuan-Zhang Fang, Xiao-Jun Yu, 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 The effects of low frequency pulsed electric field (LF-PEF) on the synthesis of tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine (DA) were studied by Western blotting and HPLC. The results showed that short exposure to low-frequency pulsed electrical field (LF-PEF) (5, 10 min) could significantly activate the express of TH and DA after short culture period (2 days). The synthesis of TH and DA was inhibited in the longer exposed groups (15, 20, 30 min) within the same short culture period. After a long culture period, the synthesis of TH and DA was inhibited in the short exposed groups, while enhanced in longer exposed groups. The related signal pathways were tested by special inhibitor of protein kinase A (PKA) (H-89) and special inhibitor of mitogen activated protein-kinase kinase (MEK1/2) (U0126). The results suggested that PKA pathway was the most important pathway involved in the normal TH synthesis and the LF-PEF stimulated TH synthesis because H-89 could totally inhibit the synthesis of TH induced by LF-PEF.

Key words low frequency pulsed electric field; PC12; tyrosine hydroxylase; dopamine; PKA pathway; Ras/MEK pathway

Received: April 7, 2006 Accepted: February 7, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.50677022)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62233549, Fax: 86-21-62233754, E-mail: hfzhang@bio.ecnu.edu.cn